

Maísa Guimarães Sartim

**Efeito da água ozonizada e gluconato de clorexidina sobre propriedades
mecânicas e microbiológicas de materiais utilizados para confecção de
próteses odontológicas**

**São José do Rio Preto-SP
2015**

Maísa Guimarães Sartim

Efeito da água ozonizada e gluconato de clorexidina sobre propriedades mecânicas e microbiológicas de materiais utilizados para confecção de próteses odontológicas

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

**São José do Rio Preto
2015**

Sartim, Maísa Guimarães.

Efeito da água ozonizada e gluconato de clorexidina sobre propriedades mecânicas e microbiológicas de materiais utilizados para confecção de próteses odontológicas / Maísa Guimarães Sartim.-- São José do Rio Preto, 2015

88f. : il., tabs.

Orientador: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Ozônio.
4. Clorexidina. 5. Teste de materiais. 6. Materiais dentários - Microbiologia.
I. Almeida, Margarete Teresa Gottardo de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
III. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Maísa Guimarães Sartim

Efeito da água ozonizada e gluconato de clorexidina sobre propriedades mecânicas e microbiológicas de materiais utilizados para confecção de próteses odontológicas

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto
Orientador (a)

Profa. Dra. Aimée Maria Guiotti
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA – UNESP

Profa. Dra. Janaína de Cássia Orlandi Sardi
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

**São José do Rio Preto
29 de Maio de 2015**

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais
José e Rosária,
pelo amor, paciência, dedicação, confiança, força e apoio
incondicionais. E ao meu namorado Avelino, amigo e
companheiro de todas as horas, pelo amor e compreensão, em mais esta
conquista que é tão minha quanto deles!!!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me guiar e conceder forças em todos os momentos.

Aos meus pais: que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um muito obrigado! Doaram-se inteiramente e renunciaram seus sonhos para que eu realizasse os meus. Iluminaram meus caminhos quando estes se tornaram obscuros e difíceis de lidar. Obrigada pelo incentivo, por acreditarem na minha capacidade, pela dedicação, paciência e compreensão durante toda essa trajetória!

Ao meu namorado, pelo amor, paciência e compreensão nos meus necessários momentos de ausência, por sempre acreditar em mim, e pelos ótimos momentos de descontração!

À toda minha família, primos (as), tios (as), avós e avôs por sempre torcerem pela realização dos meus sonhos!

À minha orientadora Margarete Teresa Gottardo de Almeida, pela oportunidade, apoio, atenção, paciência e dedicação para que esse trabalho pudesse ser realizado. Muito obrigada por todo conhecimento dispensado, pelos valiosos ensinamentos, e por fazer parte do meu crescimento pessoal e profissional!

À minha grande amiga Máira, por ajudar com a formatação do trabalho, principalmente pela amizade, carinho, atenção, apoio, companheirismo e por estar sempre pronta a me ouvir e esclarecer minhas dúvidas!

Às minhas queridas amigas Luciângela e Patrícia, pela amizade, apoio, compreensão nos momentos de ausência e pelos sábios conselhos!

À minha grande amiga Cíntia, que mesmo distante, sempre se fez presente torcendo e acreditando em mim!

À professora Dra. Aimée Maria Guiotti, pela parceria neste projeto, generosidade, atenção, paciência e disponibilidade em ajudar e esclarecer minhas dúvidas sempre que necessário, além de todo conhecimento dispensado.

Ao Professor Me. Derly, pela parceria neste projeto, por esclarecer minhas dúvidas e estar disposto a ajudar sempre.

Aos amigos do laboratório: Natália, Luciani, Eduardo, Luis Paulo, João Paulo, Evelin, Simone, Thiago Henrique, Maicon, Lorena, Emília, Mariela e Bianca, que compartilharam comigo ótimos momentos de muita descontração durante esses dois anos, que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste projeto. Em especial a Natália pela calma, atenção, paciência e orientação durante todas as etapas deste trabalho e ao Thiago imensamente, por ser tão prestativo e incansavelmente disposto a ajudar sempre que necessário.

Aos amigos e companheiros de jornada, Eduardo, Evelin e Mayra Mataruco, pela amizade, parceria e disposição em ajudar sempre!

À Luceli, técnica do laboratório de microbiologia, muito obrigada, por ser tão paciente e prestativa em todos os momentos que precisei!

À Cláudia Aparecida Rodrigues, técnica do laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura – UNESP – Jaboticabal, SP, pela sua receptividade, atenção e disposição em orientar com as análises.

À professora Dra. Elza Maria Castilho, por ser tão bondosa, estar sempre pronta a ajudar com a correção dos textos, esclarecer minhas dúvidas e pelos conselhos dispensados ao longo desta trajetória! Muito obrigada!

À professora Dra. Lilian Castiglioni, imensamente, pela sua generosidade, atenção, disponibilidade e paciência na orientação com as análises estatísticas. Muito obrigada!!!

Às professoras Dra. Elza Maria Castilho e Dra. Fátima Pereira de Sousa por participarem da banca de qualificação, contribuindo com a melhoria deste projeto.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Aimée Maria Guiotti e a Dra. Janaína de Cássia Orlandi Sardi, que tão gentilmente aceitaram dispensar seu tempo na correção deste trabalho, adicionando experiência e conhecimento ao mesmo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do IBILCE que contribuiu para meu conhecimento científico e à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pela disponibilidade do espaço físico para execução do projeto.

À OXIMED (São José do Rio Preto, SP), pelo apoio financeiro na esterilização com óxido de etileno.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos!

**“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele
lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”**

(Johann Goethe)

RESUMO

O controle de infecções da cavidade bucal e facial vem direcionando a odontologia contemporânea, na busca de novos métodos de desinfecção, mais eficazes e rápidos, tanto para usuários de próteses provisórias e aparelhos ortodônticos quanto próteses bucomaxilofaciais. O efeito antimicrobiano do ozônio em solução ou na forma gasosa vem sendo demonstrado em diversas áreas da medicina e odontologia. Este estudo teve por objetivos avaliar *in vitro* a ação da água ozonizada e da solução do gluconato de clorexidina sobre: viabilidade celular de biofilmes mono espécie de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus aureus* formados em resina acrílica e silicone e seus efeitos sobre resistência flexural da resina e dureza do silicone. Foram confeccionados 66 corpos de prova de resina acrílica incolor autopolimerizável e 156 corpos de silicone MDX4-4210, incolor e pigmentado. Para a adesão e formação dos biofilmes mono espécie, os corpos de prova foram colocados em microplacas de 96 poços, contendo 100 µL de inóculo padronizado de *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *S. aureus* (ATCC 25923) em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 com dextrose (SIGMA®), seguido de incubação e agitação constante em shaker, por 48 horas a 37°C. A cada 24 horas, nova incorporação de meio de cultura era estabelecida. Decorrido este tempo, as amostras foram submetidas ao tratamento com água ozonizada – 1,0 PPM-mg/L (2, 5 e 10 minutos) e gluconato de clorexidina (10 minutos), e seguiram para análise de viabilidade celular por redução do sal terazólico (tetrazólio hidróxido -2,3-bis (2 - metoxi - 4 - nitro - 5 - sulfenil) - 5 - [(fenilamino) carbonil] - 2H – tetrazólico - XTT) e Microscopia Eletrônica de Varredura. Para o teste mecânico de resistência flexural, os corpos de prova de resina foram divididos em dois grupos de tratamento: água ozonizada e gluconato de clorexidina 2%, enquanto para o teste de dureza os corpos de prova de silicone foram avaliados em quatro períodos distintos: recém-confeccionado (imediato); 30 dias de armazenagem em água destilada (sem tratamento); 30 dias de tratamento com água ozonizada e 30 dias de tratamento com gluconato de clorexidina 4%. Para os dois testes, foi estabelecida uma ciclagem de 30 dias consecutivos. Testes estatísticos de ANOVA, Tukey *post hoc* e T de *Student* foram aplicados para avaliação da ocorrência de significância estatística das variáveis observadas para resistência flexural e dureza. Os resultados mostraram que a água ozonizada na concentração e nos tempos acima estabelecidos não foi efetiva contra micro-organismos em biofilme. A solução de gluconato de clorexidina apresentou ação antimicrobiana considerável quando comparada à água ozonizada. Os dois tipos de tratamento adotados não apresentaram diferença com significância estatística, quanto à resistência flexural. Os dois tratamentos (água ozonizada e gluconato de clorexidina), porém ocasionaram aumento da dureza com significância estatística, no entanto, os valores mantiveram-se na faixa clinicamente aceitável. Adequações sobre os parâmetros tempo, concentração e ação contínua do ozônio deverão ser instituídas para novos protocolos de desinfecção, minimizando o risco para infecção bucomaxilofacial.

Palavras-chave: Ozônio. Biofilmes. Resinas acrílicas. Silicones. Clorexidina. *Candida albicans*. *Candida parapsilosis*. *Staphylococcus aureus*. Teste de materiais.

ABSTRACT

The need to control infections of the oral cavity and the face is directing contemporary dentistry to search for new, more effective and rapid methods of both for users of temporary prostheses and orthodontic appliances as maxillofacial prostheses. The germicidal effect of ozone in solution or as a gas has been demonstrated in several areas of medicine and dentistry. This study aimed at evaluating the *in vitro* action of ozonated water and chlorhexidine gluconate solution on the cell viability of single-species biofilms (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Staphylococcus aureus*) formed in acrylic resin and silicone and its effect on the flexural strength and hardness silicone resin. Sixty-six test pieces of colorless self-curing acrylic resin and 156 test pieces of both colorless and pigmented MDX4-4210 silicone were made. In order to form and adhere single-species biofilms to the test pieces, they were placed in 96-well microplates containing 100 μ L of standard inocula of *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) or *S. aureus* (ATCC 25923) in Roswell Park Memorial Institute dextrose (RPMI) 1640 culture medium (SIGMA[®]). Subsequently, the test pieces were incubated with constant stirring in a shaker for 48 hours at 37°C. More culture medium was added every 24 hours. Following this, the samples were treated with 1.0 ppm mg/L ozonated water for 2, 5 and 10 minutes or chlorhexidine gluconate solution for 10 minutes and the cell viability was analyzed by the tetrazolium salt reduction method (tetrazolium hydroxide-2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium-XTT) and by scanning electron microscopy. For the flexural strength test, the resin test pieces were divided into two groups: ozonated water and chlorhexidine gluconate 2%. However, for the hardness test, the silicone test pieces were divided into four groups: immediately after making and after 30 days in distilled water (no treatment); 30 days of treatment with ozonated water and 30 days of treatment with 4% chlorhexidine gluconate. The 30 consecutive day cycling program was used in both tests. The results were compared with control test pieces. Differences between groups in respect to the flexural strength and hardness were statistically analyzed employing the ANOVA, *post hoc* Tukey and Student T tests. The results showed that immersion in ozonated water at the concentration and for the time stipulated in this protocol was not effective against the biofilms. Thus, the chlorhexidine gluconate solution presented considerably better antimicrobial activity when compared to the ozonated water. There was no statistically significant difference in respect to the flexural strength between the two types of treatment (ozonated water and chlorhexidine gluconate). Moreover, although both treatments significantly increased the hardness, the values remained in the clinically acceptable range. New disinfection protocols should be evaluated using different lengths of time, concentrations and continuous ozone action with the aim of minimizing the risk of oral and maxillofacial infections.

Keywords: Ozone. Biofilms. Acrylic resins. Silicones. Chlorhexidine. *Candida albicans*. *Candida parapsilosis*. *Staphylococcus aureus*. Test materials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo geral de produção do O ₃	28
Figura 2 – Geração do O ₃ pelo método de descarga corona.....	29
Figura 3 – Matriz metálica retangular e matriz metálica circular para confecção dos corpos de prova de resina.....	42
Figura 4 – Corpos de prova de resina: circulares e retangulares.....	42
Figura 5 – Matriz metálica para confecção dos corpos de prova de silicone.....	43
Figura 6 – Corpos de prova de silicone incolor e pigmentado (médio e preto).	44
Figura 7 – Conjunto colorimétrico CHEMets [®] KIT Ozone (K-7404).	45
Figura 8 – Máquina de Ensaio Universal de Resistência Flexural – EMIC [®] DL3000	48
Figura 9 – Durômetro Digital Teclok [®] –Woltest com suporte.....	49
Figura 10 – Gráfico representativo dos valores médios de viabilidade celular (absorbância) de <i>C. albicans</i> em biofilme sobre resinas e silicones tratados com água ozonizada (2, 5 e 10 minutos) e gluconato de clorexidina (10 minutos), com respectivos controles positivos e negativos. Valores de absorbância obtidos em 492 nm.....	53
Figura 11 – Gráfico representativo dos valores médios da viabilidade celular (absorbância) de <i>C. parapsilosis</i> em biofilme sobre resinas tratadas com água ozonizada (2, 5 e 10 minutos) e gluconato de clorexidina (10 minutos), e respectivos controles positivos e negativos. Valores de absorbância obtidos em 492 nm.	54
Figura 12 – Gráfico representativo dos valores médios da viabilidade celular (absorbância) de <i>S. aureus</i> em biofilme sobre silicones tratados com água ozonizada (2, 5 e 10 minutos) e gluconato de clorexidina (10 minutos), e respectivos controles positivos e negativos. Valores de absorbância obtidos em 492 nm.	55
Figura 13 – Fotomicrografias da superfície de resina e silicone, obtidas por MEV – A – Controle negativo resina; B – Controle positivo resina <i>C. albicans</i> ; C – Controle negativo silicone; D – Controle positivo silicone <i>C. albicans</i>	56
Figura 14 – Fotomicrografias da superfície de silicone e resina, obtidas por MEV – E, F e G – Superfície de silicone com biofilme de <i>C. albicans</i> , tratada com água ozonizada por 2, 5 e 10 min., respectivamente. H, I e J – Superfície de resina com biofilme de <i>C. albicans</i> , tratada com água ozonizada por 2, 5 e 10 min., respectivamente.	56
Figura 15 – Fotomicrografias da superfície de resina, obtidas por MEV– A – Controle negativo resina; B – Controle positivo resina <i>C. parapsilosis</i>	57

- Figura 16** – Fotomicrografias da superfície de resina, obtidas por MEV – C, D e E – Superfície de resina com biofilme de *C. parapsilosis*, tratada com água ozonizada por 2, 5 e 10 min., respectivamente.57
- Figura 17** – Fotomicrografias da superfície de silicone, obtidas por MEV – A – Controle negativo silicone; B – Controle positivo silicone *S. aureus*.57
- Figura 18** – Fotomicrografias da superfície de silicone, obtidas por MEV – C, D e E – Superfície de silicone com biofilme de *S. aureus*, tratada com água ozonizada por 2, 5 e 10 min., respectivamente.58
- Figura 19** – Fotomicrografias da superfície de resina, obtidas por MEV – A e B – Superfície de resina com biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, respectivamente, tratada com gluconato de clorexidina por 10 min.58
- Figura 20** – Fotomicrografias da superfície de silicone, obtidas por MEV – A e B – Superfície de silicone com biofilme de *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente, tratada com Gluconato de clorexidina por 10 min.59

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Agentes oxidantes e respectivos potenciais de oxidação.....	30
Tabela 2 – Relação da temperatura e da solubilidade do ozônio em água.	31
Tabela 3 – Valor do residual de O ₃ obtido nos experimentos.	52
Tabela 4 – Valores médios da Resistência Flexural (MPa) e desvio padrão (dp) após tratamento com água ozonizada (10 minutos, uma vez ao dia, durante 30 dias) e gluconato de clorexidina (10 minutos, uma vez ao dia, durante 30 dias).	59
Tabela 5 – Média geral da dureza SHORE A, independente da pigmentação do silicone, nos diferentes períodos, após desinfecção de 30 dias com água ozonizada.....	60
Tabela 6 – Valores médios da dureza SHORE A de cada grupo de silicone, em função ou não da pigmentação, nos diferentes períodos, após a desinfecção de 30 dias com água ozonizada.	61
Tabela 7 – Média geral da dureza SHORE A, independente da pigmentação do silicone, nos diferentes períodos, após desinfecção de 30 dias com gluconato de clorexidina.....	62
Tabela 8 –Valores médios da dureza SHORE A de cada grupo de silicone, em função ou não da pigmentação, nos diferentes períodos, após a desinfecção de 30 dias com gluconato de clorexidina.	63
Tabela 9 – Comparação entre os valores médios da dureza para os dois tipos de tratamento, água ozonizada e gluconato de clorexidina, após 30 dias, independente do grupo de silicone.	63
Quadro 1 – Distribuição da ocorrência de micro-organismos submetidos ao ozônio e respectivos valores de interferência.....	34
Quadro 2 – Local dos experimentos.....	41
Quadro 3 – Caracterização do silicone incolor e dos pigmentos utilizados para confecção dos corpos de prova.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABOZ – Associação Brasileira de Ozonoterapia

ADA – *American Dental Association*

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AS – *Ágar Sabouraud*

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (SOCIEDADE AMERICANA PARA TESTES E MATERIAIS)

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

°C – Graus Celcius

CFU/mL – *Colony-Forming Unit by Milliliter* (Unidade Formadora de Colônias por Mililitro)

dp – Desvio padrão

EPA – *Enviromental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental)

EPRI – *Eletric Power Research Institute* (Instituto de Pesquisa de Energia Elétrica)

ECTFE – *Ethylene Chlorotrifluoroethylen* (Etileno Clorotrifluoretileno)

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FDA – *Food and Drug Administration*

GRAS – *General Recognized As Safe*

g/h – Gramas por Hora

Kg – Quilograma

Kgf – Quilograma-força

log – Logaritmo

LPM – Litro por Minuto

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

µg/L – Micrograma por Litro

µg/mL – Micrograma por Mililitro

µL – Microlitro

µL/mL – Microlitro por Mililitro

mg/L – Miligrama por Litro

mg/mL – Miligrama por Mililitro

mg/minuto – Miligrama por Minuto

mL – Mililitro

mM – Milimolar
mm – Milímetro
Min. – minuto (s)
M – Molar
MPa – Unidade de medida utilizada para resistência flexural
mV – Milivolt
N – Newton
nm – Nanômetro
PBS – Tampão Fosfato Salino
pH – Potencial Hidrogeniônico
PMMA – Polimetilmetacrilato
p/p – Porcentagem em peso por peso ou Percentagem em peso
PPM – Partes por Milhão
PTFE – Politetrafluoretileno - Teflon
PVC – *Polyvinyl Chloride* (Policloreto de Polivinila ou Policloreto de Vinil)
PVDF – *Polyvinylidene Difluoride* ou *Polyvinylidene Difluoride* (Fluoreto de Polivinilideno ou Difluoreto de Polivinilideno)
RAAQ – Resina acrílica ativada quimicamente
rpm – Rotações por Minuto
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*
S. – *Staphylococcus*
SHORE A – Unidade de medida da dureza
SP – São Paulo
UFC – Unidade Formadora de Colônias
UFC/cm² – Unidade Formadora de Colônias por Centímetro Quadrado
UFC/g – Unidade Formadora de Colônias por Gramas
UFC/mL – Unidade Formadora de Colônias por Mililitro
XTT – Tetrazólio hidróxido – 2,3 – bis (2 – metoxi – 4 – nitro – 5 – sulfenil) – 5 – [(fenilamino) carbonil] – 2H – tetrazólico

LISTA DE SÍMBOLOS

Co – Cobalto

°C – Graus Celsius

OH⁻ – Íons Hidroxila ou Oxidrila

> – Maior

≥ – Maior ou igual

± – Mais ou menos

® – Marca Registrada

< – Menor

≤ – Menor ou igual

N₂ – Nitrogênio

O₃ – Ozônio

Fe₂O₃ – Óxido de Ferro

O₂ – Oxigênio

% – Porcentagem

OsO₄ – Tetróxido de Ósmio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1 Histórico – ozônio.....	26
2.2 Produção do ozônio.....	27
2.3 Propriedades físico-químicas do ozônio.....	30
2.4 Ação antimicrobiana do ozônio.....	32
3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	37
4 OBJETIVOS.....	39
4.1 Objetivos gerais.....	39
4.2 Objetivos específicos.....	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5.1 Local dos experimentos.....	41
5.2 Confeção dos corpos de prova.....	41
5.2.1 Corpos de prova de resina.....	42
5.2.2 Corpos de prova de silicone.....	43
5.3 Produção da água ozonizada.....	44
5.4 Mensuração do ozônio.....	45
5.5 Obtenção das cepas microbianas.....	45
5.6 Formação do biofilme.....	46
5.7 Análise da viabilidade celular.....	46
5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	47
5.9 Teste de resistência flexural – resinas.....	47
5.10 Teste de dureza – silicones.....	48
5.11 Análise Estatística.....	50
6 RESULTADOS.....	52
6.1 Mensuração do residual de ozônio.....	52
6.2 Análise da viabilidade celular.....	52
6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
6.4 Teste de resistência flexural – resinas.....	59
6.4.1 Teste de resistência flexural após tratamento com água ozonizada e gluconato de clorexidina.....	59
6.5 Teste de dureza – silicones.....	60
6.5.1 Teste de dureza após tratamento com água ozonizada.....	60
6.5.2 Teste de dureza após tratamento com gluconato de clorexidina.....	61
7 DISCUSSÃO.....	65
8 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é um ecossistema microbiológico em equilíbrio saprofítico e, como em outras superfícies do corpo, tem uma microbiota diversificada, podendo formar biofilmes estrutural e funcionalmente muito organizados (FALCÃO; SANTOS; SAMPAIO, 2004; MARSH; HEAD; DEVINE, 2015). Neste ambiente, fatores bióticos e abióticos modificam a colonização microbiana, permitindo que novas populações possam se estabelecer e desenvolver (TAKAHASHI, 2005; MADIGAN et al., 2010).

Dentre os micro-organismos que compõem esta microbiota, além das bactérias, grande parte é constituída de leveduras do gênero *Candida*, sendo a espécie *albicans* presente na cavidade bucal em, aproximadamente 50% da população humana, geralmente como comensal, sem causar prejuízos. Entretanto, em determinadas circunstâncias, dependentes do hospedeiro, como doenças sistêmicas (diabetes e AIDS), fatores nutricionais, terapia com antibióticos de amplo espectro, imunossupressores e ainda fatores locais como o uso de dispositivos (próteses e aparelhos) e a capacidade de formar biofilme, *C. albicans* pode atuar como agente infeccioso, ocasionando a candidose crônica atrófica, uma inflamação da mucosa oral, que pode apresentar sérios prejuízos inviabilizando o uso destes dispositivos (SIQUEIRA; BILGE, 2004; CALCATERRA et al., 2013; BRAZ et al., 2014).

Adicionalmente à espécie *C. albicans*, *C. parapsilosis* tem se destacado como um importante patógeno nos quadros de candidíase, e é considerada espécie emergente, associada à dispositivos protéticos (KRCMERY; BARNES, 2002; MATSUMOTO et al., 2002; CANTÓN et al., 2011). Seu principal fator de virulência está ligado à capacidade de aderir às superfícies inertes, e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de biofilme (BERNARDIS et al., 1999; DOUGLAS, 2003).

A pele como nicho biótico, em condições normais, é rica em micro-organismos, com destaque para as espécies bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, e a espécie fúngica *C. albicans*. No entanto, a composição desta microbiota pode ser modificada, dependendo de fatores como umidade, temperatura, bem como, condições do próprio hospedeiro, o que pode ocasionar a formação de biofilmes capazes de contaminar mucosas e tecidos adjacentes a ela, propiciando o desenvolvimento de infecções. (YU; KORAN; CRAIG, 1980; TURNER et al., 1984; NEVES; VILELLA, 1998; KIAT-AMNUAY; LEMON; POWERS, 2002; KIAT-AMNUAY et al., 2006).

As espécies de *Candida* se destacam pela capacidade de formar biofilmes, na maioria das vezes resistentes a diversas drogas (RAJENDRAN et al., 2010; SARDI et al., 2013). O biofilme pode ser definido como um conjunto de micro-organismos distintos ou não, que convivem em associação, formando uma comunidade multicelular específica, altamente organizada e estruturada (SOLL, 2008; RAMAGE et al., 2009; SARDI et al., 2013) constituída de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (FLEMMING; WINGENDER, 2010), tanto sob os tecidos vivos, quanto em superfícies abióticas (próteses, cateteres, entre outros) (DONLAN; COSTERTON, 2002, SOLL, 2008; FLEMMING; WINGENDER, 2010). Essas comunidades se mantêm sob o controle de moléculas sinalizadoras e não por meras acumulações de células resultantes da divisão celular (BRAZ et al., 2014). Além disso, se caracterizam por uma heterogeneidade funcional, que constitui um modo de crescimento protegido permitindo a sobrevivência, mesmo em ambientes hostis (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

Dentre as propriedades do biofilme, destacam-se a maior resistência a forças físicas, a agentes antimicrobianos e variações ambientais e nutricionais, bem como uma maior proteção contra as defesas imunes do hospedeiro (RAMAGE et al., 2001; DOUGLAS, 2003; LEID et al., 2005; RAMAGE et al., 2009; WRIGHT et al., 2013).

Vários métodos de análise do biofilme têm sido estabelecidos, com destaque aos recursos microscópicos, de análise citológica, e ensaios colorimétricos para viabilidade celular. Nesse sentido, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revela de forma qualitativa, o potencial de estruturação de células sésseis ou planctônicas. Em adição, o método colorimétrico investiga a viabilidade celular por redução do sal tetrazólico - tetrazólio hidróxido -2,3-bis (2 - metoxi - 4 - nitro - 5 - sulfenil) - 5 - [(fenilamino) carbonil] - 2H – tetrazólio (XTT), método que representa um dos melhores recursos práticos para análise de biofilme (HAWSER et al. 1998; MARTINEZ; CASADEVAL, 2007; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008; NETT et al., 2011; PITANGUI et al., 2012; ZHOU et al., 2012).

Tendo como base a possível formação de biofilmes, na ortodontia, a falta do polimento de resinas acrílicas, utilizadas para a confecção de aparelhos ortodônticos, pode levar a alterações físicas que potencializam a colonização microbiana desse material e, conseqüentemente, aumentam o risco de doença bucal, devido à aderência de micro-organismos (SCHEIE, et al., 1984; ANUSAVICE, 1998; FALCÃO; SANTOS; SAMPAIO, 2004).

A resina sintética mais utilizada na ortodontia é a resina acrílica – polimetilmetacrilato (PMMA), também chamada de polímero, e pode ser de dois tipos: termoplástica, quando amolece novamente se reaquecida e termopolimerizável, quando se torna resistente à deformação (PHILLIPS, 1993; ANUSAVICE, 1998).

Este tipo de material é comercializado nas formas de pó e líquido. O pó é o polimetacrilato de metila, pré-polimerizado, na forma de partículas esféricas muito pequenas, contendo pigmentos corantes, com um iniciador ativo, o peróxido de benzoíla. O líquido é o monômero de metacrilato de metila, com adição de um inibidor, a hidroquinona. Quando misturados, pó e líquido produzem uma massa plástica que pode ser moldada à forma desejável. O processo de polimerização é acompanhado de aquecimento. Nas resinas de polimerização a frio (quimicamente ativadas) é incorporado ao monômero um ativador do iniciador, geralmente uma amina terciária (dimetil-para-toluidina). Quando misturados, pó e líquido, o ativador reage com o iniciador, o qual rompe as ligações insaturadas do monômero, causando assim a polimerização (ANUSAVICE, 1998).

O teste mecânico de resistência flexural destina-se a avaliar a capacidade das resinas acrílicas de resistir a uma deformação sem fraturar-se. Esta resistência pode sofrer influência de alguns fatores como a própria manipulação destas resinas, o uso de soluções químicas desinfetantes, dentre outros (MALLMANN et al., 2009; OLIVEIRA, 2011).

Outro recurso utilizado na odontologia é a prótese bucomaxilofacial, a qual possibilita a reabilitação de pessoas portadoras de deformidades faciais com perdas de tecido em orelha, olho, nariz, maxila, mandíbula, dentre outras (BENOIST, 1962; BULBULIAN, 1965; ORIBE, 1965; MOORE et al., 1977; HANSON et al., 1983; POLYZOIS, 1999a; BAI et al., 2014)

Para este tipo de prótese, a resina acrílica termicamente ativada e os silicones polimerizados pelo calor ou pela temperatura ambiente, constituem os recursos materiais de eleição (BULBULIAN, 1965; POLYZOIS, 1999a). No entanto, o silicone, atualmente, é o material mais utilizado, devido à boa flexibilidade, conforto ao paciente e textura semelhante à pele humana (ORIBE, 1965; MITRA et al., 2014), sendo o Silastic MDX4-4210, a escolha mundial para a confecção das próteses faciais (ORIBE, 1965; YU; KORAN; CRAIG, 1980; TURNER et al., 1984; LEMON et al., 1995; NEVES; VILELLA, 1998; KIAT-AMNUAY; LEMON; POWERS, 2002; GUIOTTI; GOIATO, 2003; 2004; KIAT-AMNUAY et al., 2006; MANCUSO; GOIATO; SANTOS, 2009; GOIATO et al., 2010a).

Estas próteses de silicone são de durabilidade relativamente limitada, geralmente de dois anos ou menos, isto se deve a fatores como: descoloração, deterioração do material (VISSER et al., 2008; ARIANI et al., 2013). Fatores como a higiene pessoal, a poluição ambiental, a exposição a raios UV, a temperatura e a umidade, a deposição de resíduos nas porosidades da superfície, o uso de adesivos, manuseamento são determinantes para deterioração dessas próteses (GUIOTTI; GOIATO; SANTOS, 2010; SANTOS et al., 2012; ARIANI et al., 2013). Além disso, secreções da própria pele, como o suor e o sebo (POLYZOIS et al., 2000; KURTULMUS et al., 2010), assim como, o uso contínuo de produtos químicos para limpeza e desinfecção, contribuem definitivamente para que ocorram alterações do material (GUIOTTI; GOIATO; SANTOS, 2010; SANTOS et al., 2012; ARIANI et al., 2013; ELENI et al., 2013).

Para comprovar a qualidade das próteses constituídas por silicone, um dos quesitos, deve avaliar a flexibilidade, ou seja, a sua dureza, medida em unidade SHORE A. Este parâmetro é indicativo da textura, devendo situar-se entre 25 a 35 unidades SHORE A, para um material utilizado em prótese facial (CARVALHO, 1989; VERES; WOLFAARDT; BECKER, 1990).

Na prática clínica odontológica, diversos procedimentos físico-químicos de limpeza e desinfecção de próteses e aparelhos são adotados. Soluções químicas convencionais como sabão neutro, hipoclorito de sódio 1%, soluções efervescentes de bicarbonato de sódio e gluconato de clorexidina de 2% a 4% constituem-se como recursos mais comuns de higienização (GOIATO et al., 2009; GOIATO et al., 2010a; GOIATO et al., 2010b; PESQUEIRA et al., 2011). No entanto, estes produtos interferem sobre as propriedades mecânicas dos materiais, alterando sua cor e superfície, o que potencializa o risco às infecções (ROSE et al., 2000; GOIATO et al., 2009; GOIATO et al., 2010a; PESQUEIRA et al., 2011).

Novas alternativas de controle microbiano surgem neste contexto, e o ozônio, um gás com alto teor oxidante, destaca-se dado e comprovado seu potencial de esterilização e desinfecção em diversos segmentos, inclusive na odontologia (ALMEIDA et al., 2004; FARIA et al., 2005; DE BOER et al., 2006; NOGALES et al., 2008; CABO et al., 2009; BIALOSZEWSKI et al., 2011; SAINI, 2011; SADATULLAH; MOHAMED; RAZAK, 2012; NOGALES et al., 2014; AL-SAAD et al., 2015). Nesta área, o ozônio tem sido proposto como uma alternativa antisséptica, em função de sua potente ação antimicrobiana e alta biocompatibilidade. Na periodontia, o ozônio é utilizado na forma aquosa em bochechos, favorecendo a diminuição da adesão de placa à superfície dental e também neutralizando

culturas de *S. aureus*. A eficiente ação da água ozonizada também já foi demonstrada na redução de *C. albicans* aderidas às próteses totais (VELANO et al., 2001; NOGALES et al., 2008; JOHANSON; CLAESON, 2009; HUTH et al., 2011; GOPALAKRISHNAN; PARTHIBAN, 2012; FERREIRA et al., 2013; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONOTERAPIA, 2015).

A inativação de micro-organismos pelo ozônio é um processo complexo, pois ataca vários constituintes celulares: proteínas, lipídios insaturados, enzimas da membrana celular, peptideoglicano, ácidos nucleicos, (DIAO et al., 2004; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM., 2004; SEIDLER et al., 2008; ZHANG et al., 2011) tanto para formas vegetativas, quanto para esporos (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001, MAHFOUDH et al., 2010).

Desta forma, o ozônio vem ganhando destaque, especialmente, quando a terapia antibiótica não é capaz de controlar os micro-organismos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico-ozônio

O ozônio (O_3) foi descoberto em 1839 por Schonbein (LAPOLLI et al., 2003), e, em 1848, foi reconhecido como forma alotrópica do oxigênio (O_2) (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; VIDAL, 2003). Em 1866, Meritens o reconheceu como potente desinfetante de água (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; LAPOLLI et al., 2003). Estudos sobre a atividade germicida do ozônio iniciaram-se em 1889, pelo químico francês Marius Paul Otto, na Universidade de Sorbone, em Paris (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991).

A primeira aplicação do ozônio em grande escala ocorreu em 1893 no tratamento de água em Oudshoorn, na Holanda (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; LAPOLLI et al., 2003). Poucos anos depois, em 1897, o químico Marius Paul Otto criou a primeira companhia especializada na construção e instalação de equipamentos de ozonização para tratamento de água (LAPOLLI et al., 2003). A partir deste momento, a construção de plantas de tratamento de água estendeu-se por grande parte da Europa incluindo algumas cidades da França, Alemanha, antiga União Soviética, Espanha, chegando até o continente americano, nos Estados Unidos. Em 1914, o número de instalações cresceu rapidamente chegando a cerca de 100 estações de tratamento de água na França (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991). Desde então o ozônio passou a ser utilizado no tratamento de água para abastecimento público em toda a Europa (GRAHAM, 1997; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004).

Na área médica (ozonoterapia), o ozônio é utilizado desde o século XIX e os primeiros estudos a respeito foram desenvolvidos na Alemanha. Durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918) médicos alemães e ingleses utilizaram o ozônio para o tratamento de feridas em soldados. Erwin Payr (cirurgião e professor) teve a experiência do tratamento com ozônio por seu dentista (E. A. Fisch), e em 1935 apresentou uma publicação intitulada de "O tratamento com ozônio na cirurgia". Este foi o início da ozonoterapia que se conhece hoje. Em 1975, o uso do ozônio na área médica foi introduzido no Brasil, pelo médico Heinz Konrad, em São Paulo-SP. Mais tarde, em 1979, o pesquisador Hans H. Wolff publicou um livro "O Ozônio Medicinal," no qual apresentou sua pesquisa e prática médica do uso do ozônio. E neste mesmo ano ele fundou a Sociedade Médica Alemã de Ozônio, posteriormente renomeada de Sociedade Médica para Aplicação Preventiva e Terapêutica do Ozônio, considerada uma das

mais importantes entre as associações de ozônio de todo o mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONOTERAPIA, 2015).

Em 1982, o ozônio foi considerado como um produto seguro - “*General Recognized As Safe*” (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento e descontaminação de garrafas de água. Já na década de 90, nos Estados Unidos, o ozônio foi reconhecido como substância GRAS para aplicação direta em alimentos (GRAHAM, 1997) e, oficialmente, atribuído como agente sanificante seguro, em 1997, pelo *Electric Power Research Institute* (EPRI), com avanços subsequentes de sua aplicação segura (UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1997).

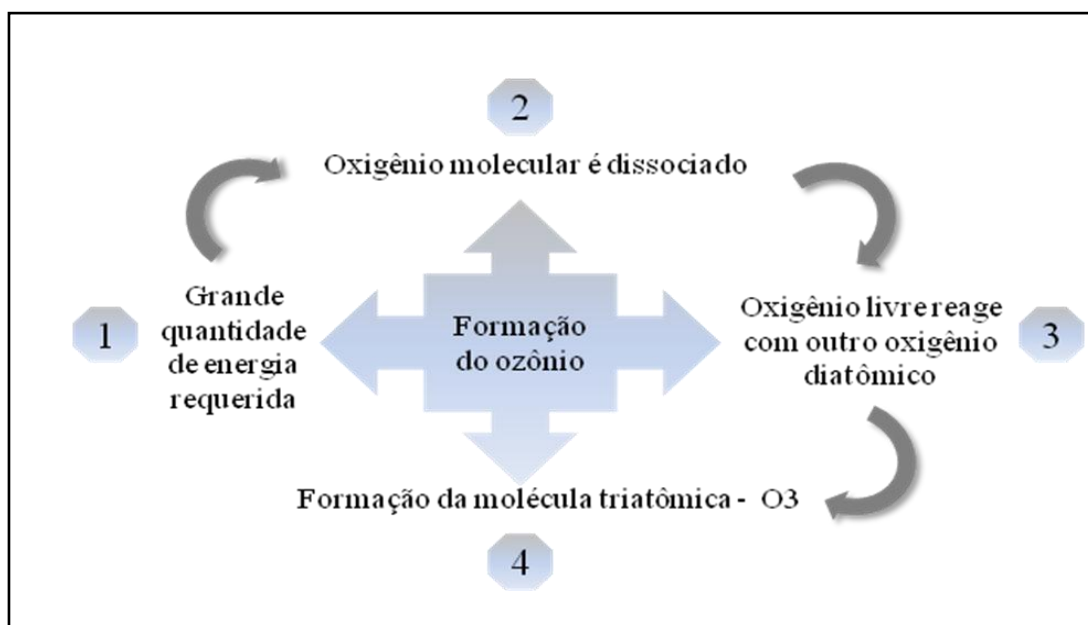
Em 2006, no Brasil, foi fundada a Sociedade Brasileira de Ozonoterapia (ABOZ), a qual passou a trabalhar para que esta prática no país pudesse ser realizada de maneira legal, consciente, responsável e ética (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONOTERAPIA, 2015).

De acordo com Saini (2011) a aplicação do ozônio na medicina e odontologia já foi indicada para o tratamento de aproximadamente 260 patologias diferentes. Atualmente, a ozonoterapia é reconhecida pelo Sistema de Saúde da Alemanha, Suíça, Áustria, Itália, Cuba, Ucrânia, Rússia, Grécia, Israel, Egito, Austrália, bem como praticada em 13 estados dos Estados Unidos da América (EUA). Na Rússia, é aplicada em quase todos os hospitais públicos com aprovação do Ministério da Saúde. Na Espanha, Canadá, México, alguns Estados Norte-Americanos e países da Ásia como China, Malásia e Coreia, a incorporação do ozônio nas práticas hospitalares ganha relevância, uma vez que, os benefícios para os pacientes são expressivos (MARIÑO; SCWHARTZ, 2012; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONOTERAPIA, 2015).

2.2 Produção do ozônio

Na formação do O_3 , ocorre uma reação altamente endotérmica e não espontânea com grande gasto de energia, na qual, o oxigênio molecular é dissociado e o oxigênio livre resultante reage com outro oxigênio diatômico para formar a molécula triatômica de ozônio (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999; VIDAL, 2003). Este processo de formação do O_3 está ilustrado na Figura 1

Figura 1 – Mecanismo geral de produção do O₃.

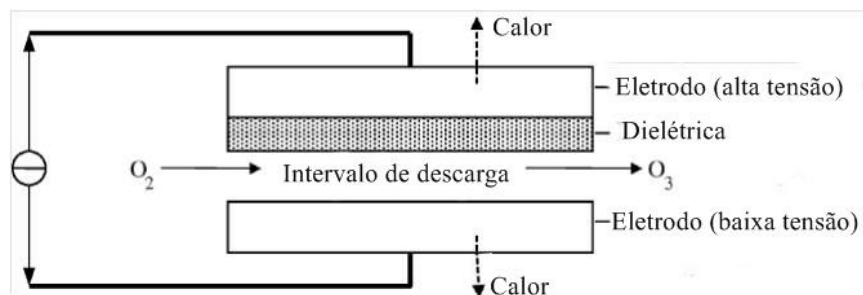


Fonte: Do autor

Na estratosfera, o O₃ é formado naturalmente em pequenas quantidades por meio da radiação solar sobre o oxigênio. Na troposfera, uma pequena quantidade de ozônio é produzida, resultante de reações fotoquímicas entre hidrocarbonetos, oxigênio e nitrogênio (N₂), oriundos de automóveis, indústrias, florestas e ação vulcânica. O gás, assim produzido, é instável e decompõe-se rapidamente (HORVÁTH; BILITZKY; HUTTNER, 1985).

Uma forma alternativa de produção do O₃ ocorre por descarga eletroquímica, conhecida como efeito corona. Este é o processo mais utilizado por indústrias, pois gera maior quantidade de ozônio com menor custo (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001). O equipamento gerador do efeito corona é constituído por dois eletrodos, submetidos a diferentes potenciais de ação e com a passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos, o O₃ é gerado. Deste modo, quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de oxigênio, surgem colisões, que levam à dissociação do oxigênio e a consequente formação do O₃ (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004). A Figura 2 mostra o esquema de um gerador de O₃ pelo processo corona.

Figura 2 – Geração do O₃ pelo método de descarga corona.



Fonte: Adaptado de Rice et al. (1981).

O O₃, quando gerado a partir do ar, depende de um pré-tratamento, que inclui filtração, compressão, resfriamento e desumidificação. No entanto, quando gerado a partir do oxigênio puro, é necessário um tanque de oxigênio líquido, precedido de um evaporador. As vantagens de utilizar um ozonizador alimentado com oxigênio puro estão no menor custo de manutenção, maior rendimento e praticidade (LAPOLLI et al., 2003).

Vários métodos são utilizados para quantificar o O₃ e são classificados em físicos, físico-químicos e químicos. Os métodos físicos medem a capacidade de absorção de radiações no espectro visível, ultravioleta (UV) ou infravermelho. Os físico-químicos medem o efeito físico da reação do O₃ com substâncias quimioluminescentes. Os químicos medem a quantidade de produtos formados quando o O₃ reage com o iodeto de potássio ou iodeto de hidrogênio (WICKRAMANAYAKE, 1991; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001).

O método colorimétrico do índigo, que consta no protocolo “*Standards methods for the examination of water and wastewater*”, foi desenvolvido por Barder & Hoigné, e é considerado método padrão ouro para medida do O₃, aceito inclusive pelo *Environmental Protection Agency* (EPA). A oxidação do corante índigo pela molécula de O₃, causando redução na intensidade da cor azul é o seu princípio técnico (BADER; HOIGNÉ, 1982; STANDARD METHODS OF WATER ORGANIZATION, 1997; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999).

2.3 Propriedades físico-químicas do ozônio (O₃)

O ozônio, uma molécula triatômica, composta por três átomos de oxigênio, consiste em um gás instável, parcialmente solúvel em água e é caracterizado por odor penetrante e pungente (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; LAPOLLI et al., 2003; DI BERNARDO; DANTAS, 2005; SAINI, 2011).

Em baixas concentrações (0,01 a 0,05 miligramas por Litro - mg/L) este gás é incolor e pode ser facilmente detectado. Ao contrário, em concentrações mais elevadas adquire uma coloração azulada (RICE et al., 1981; LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999; LAPOLLI et al., 2003).

Dentre os agentes oxidantes, o ozônio se destaca pelo elevado potencial de oxidação (2,07 milivolts – mV) e, por isso, é o segundo mais poderoso agente oxidante, perdendo apenas para o flúor (3,06 mV) (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; LAPOLLI et al., 2003). A Tabela 1 mostra o valor do potencial de oxidação do ozônio comparado aos outros agentes oxidantes.

Tabela 1 – Agentes oxidantes e respectivos potenciais de oxidação.

Agente oxidante	Potencial de oxidação (mV)
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36

Fonte: Guzel-Seydim; Greene; Seydim (2004).

Com o aumento da temperatura, o ozônio tem sua solubilidade em água diminuída e torna-se menos estável, sem perder o poder de desinfecção. De fato, embora sua solubilidade esteja diminuída, a difusão é aumentada, o que favorece a destruição microbiana (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999; LAPOLLI et al., 2003).

O potencial hidrogeniônico (pH) é outro fator que exerce influência sobre o ozônio. Assim, quando alcalino, favorece a sua decomposição e, como consequência, surgem diferentes tipos de compostos oxidantes, como, íons hidroxila (OH⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), entre outros (LAPOLLI et al., 2003; DI BERNARDO; DANTAS, 2005). De outro modo, o pH, quando ácido, parece acelerar o processo de inativação microbiana (ZUMA; LIN; JONNALAGADDA, 2009).

Em solução aquosa, o O₃ é relativamente instável e apresenta meia-vida que varia de 20 a 30 minutos a 20°C (WICKRAMANAYAKE, 1991; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; VIDAL, 2003). Entretanto, quando submetido à acidificação e/ou redução de temperatura, outros estudos identificaram maior estabilidade do O₃ por um tempo superior, em média de 165 minutos (WALTER; SHERMAN, 1976; YANG; CHEN, 1979; RICE et al., 1981; DI BERNARDO; DANTAS, 2005). A Tabela 2 apresenta a relação da temperatura e da solubilidade do O₃ em água.

Tabela 2 – Relação da temperatura e da solubilidade do ozônio em água.

Temperatura (°C)	Solubilidade (Litros de ozônio/Litros de água)
0	0,640
15	0,456
27	0,270
40	0,112
60	0,000

Fonte: Rice et al. (1981).

De acordo com a *United States Environmental Protection Agency* (1999), a meia-vida do ozônio é de 12 horas na fase gasosa, mais estável se comparada a do ar atmosférico.

Ao reagir com a matéria orgânica, o gás ozônio oxida alguns compostos e se decompõe em O₂ e radicais livres, gerando oxidantes secundários, que reduzem a atividade antibacteriana, fato comprovado nos estudos de Yang e Chen, (1979); Staehelin e Hoigné (1985) e Restaino et al., (1995).

Outro fator de impacto para estabilidade do ozônio se deve à propriedade apresentada de diversos equipamentos geradores. Assim, o tamanho das bolhas geradas reflete a uma maior ou menor variação de atividade: quanto menores as bolhas, maior a superfície de

contato, e, portanto, maior sua estabilidade. Da mesma forma, sobre agitação constante, nota-se um aumento considerável do contato e da solubilidade (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001).

A decomposição do ozônio pode ser acelerada por interferência de processos químicos ou físicos. Assim, a radiação ultravioleta e a presença de catalisadores a base de paládio, manganês ou óxido de metais, além de hidróxidos e peróxidos, o desestabilizam, tornando menos ativo (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; LAPOLLI et al., 2003).

Os materiais e equipamentos utilizados também exercem influência sobre o perfil de atividade do ozônio, sendo o aço inoxidável, os plásticos, a borracha natural e o silicone, os materiais de escolha para este fim. Os plásticos como o Politetrafluoretileno (PTFE), Fluoreto de Polivinilideno ou Difluoreto de Polivinilideno (PVDF), Policloreto de Polivinila ou Policloreto de Vinil (PVC) e Etileno Clorotrifluoretileno (ECTFE) se destacam pelo bom desempenho, quando em contato com o ozônio e pela maior resistência à corrosão, propriedade também observada para o aço inoxidável (GREEN; SMITH; KNIGHT, 1999; SINGH; SINGH, 1999). A borracha natural é altamente sensível ao contato com o ozônio, o que leva à desintegração total da mesma (KIM; YOUSEF; KHADRE, 2003), porém, o silicone é mais resistente com menor tempo de exposição (PIRANI, 2011).

2.4 Ação antimicrobiana do ozônio

O efeito antimicrobiano do ozônio contra bactérias, bolores, leveduras, vírus, protozoários, bem como esporos de fungos e bactérias, ocorre devido a uma de suas principais propriedades físico-químicas, o alto poder oxidante capaz de destruir diretamente todos os micro-organismos (KIM; YOUSEF; CHRISM, 1999; STUBINGER; SADER; FILIPPI, 2006; NAGAYOSHI et al., 2004b; BIALOSZEWSKI et al., 2010; SADATULLAH; MOHAMED, RAZAK, 2014).

A inativação dos micro-organismos pelo ozônio é um processo complexo, pois ataca uma série de constituintes celulares, incluindo proteínas, lipídeos insaturados, enzimas respiratórias, peptídeo-glicano e ácidos nucleicos (BABLON et al., 1991; VICTORIN, 1992; HUNT; MARINÑAS, 1997; ARANA et al., 1999; SEIDLER et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

De acordo com Seidler et al. (2008) o efeito antimicrobiano do ozônio contra os micro-organismos é um resultado de sua ação sobre a membrana citoplasmática devido a

ozonólise de ligações duplas e também à ocorrência de modificações do conteúdo intracelular em consequência de efeitos oxidantes secundários. Esta ação é seletiva para células microbianas, mas não danifica células do corpo humano por causa de sua grande capacidade antioxidante.

Em um estudo realizado por Cho et al. (2010), utilizando a bactéria *Escherichia coli* para testar a ação de diversos desinfetantes químicos, constatou-se que o ozônio, em função de seu alto teor oxidante, apresentou maior efeito atingindo diretamente estruturas superficiais da célula bacteriana, enquanto outros desinfetantes destacaram-se por atacar elementos internos do micro-organismo testado.

O ozônio é capaz de inativar bactérias de forma eficaz, com a vantagem de que os tempos de contato para a ação antimicrobiana são de 4 a 5 vezes mais curtos em comparação com o cloro (ZUMA; LIN; JONNALAGADDA, 2009; ZUMA; JONNALAGADDA, 2010).

A atividade do ozônio foi demonstrada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (NAGAYOSHI et al., 2004b; ALMÁZ; SONMEZ, 2015), bem como para os esporos, sempre mais resistentes do que a forma vegetativa (PIRANI, 2011). Quando comparada a ação inibitória entre os dois grupos de bactérias, as Gram-negativas mostraram maior sensibilidade, devido à menor quantidade de peptidoglicano em sua parede celular (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; NAGAYOSHI et al., 2004b; SHARMA; HUDSON, 2008).

De outro modo, o processo de ozonização é também efetivo contra fungos e tem se mostrado potencialmente aplicável em degradar os produtos secundários de seu metabolismo, como as micotoxinas (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; KIM; YOUSEF; DAVE, 1999; LUO et al., 2014). Em estudos anteriores, Wickramanayake (1991) demonstrou que, em menor exposição, os fungos foram mais sensíveis que bactérias como *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Bacillus spp.* Quando compararam fungos filamentosos e leveduras, as últimas foram mais sensíveis ao ozônio, evento apresentado pelo estudo de Kim, Yousef e Dave (1999).

A ação antimicrobiana do ozônio depende de fatores como o tempo de exposição, a concentração do ozônio, e ainda da sensibilidade da espécie microbiana e sua concentração inicial (BAYSAN; WHILEY; LINCH, 2000; HASS & KAYMAK, 2003; LAPOLLI et al., 2003; CELIBERTI; PAZERA; LUSSI, 2006; LUDDEKE et al., 2015).

Uma série de estudos listados logo a seguir (Quadro1), demonstram diversas formas de aplicação do ozônio na microbiologia, bem como seu respectivo potencial de ação antimicrobiana em relação ao tempo e concentração.

Quadro 1 – Distribuição da ocorrência de micro-organismos submetidos ao ozônio e respectivos valores de interferência.

Autor/Data	Tipo de micro-organismo	Concentração de ozônio	Tempo de contato	Potencial de ação (Redução em log ou contagem ⁰)	Material testado
Finch, Smith e Stiles (1988)	Bactéria	4,4 a 800 microgramas/L	30 a 120 segundos	0,5 a 6,5 logaritmos (log) em contagem	População de <i>E. coli</i>
Ramirez et al. (1994)	Bactéria	8% (p / p)	15 segundos	1 log	Pele de frango inoculada com <i>Salmonella enteritidis</i>
Korol et al. (1995)	Várias bactérias	0,33 mg/L	_____	5 log	Amostras de água inoculadas artificialmente
Restaino et al. (1995)	Leveduras	_____	5 minutos	4,5 log	O próprio micro-organismo
Torres, Regê Ferreira e Rímoli (1996)	Não especificado	2,1 Partes por milhão (PPM)	_____	95%	Carcças de frango
Dave et al. (1998)	Bactéria	1,5 PPM	_____	6 log	População de <i>Salmonella enteritidis</i> em água destilada
Kim, Yousef e Chrism (1999)	Bactérias	1,3 Milimolar (mM)	3 minutos	2 log Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g) em contagem total	Alface picada
Velano et al. (2001)	Bactéria	_____	_____	100%	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>
Cardoso et al. (2003)	Micro-organismos aeróbios heterotróficos/bactérias	4 mg/L	2 minutos	13% a 100%	Sanitização de galões de água de 20 Litros
Nagayoshi et al. (2004a)	Bactérias	_____	_____	Viabilidade diminuída	Dentes bovinos contaminados com <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Streptococcus mutans</i>
Faria et al. (2005)	Leveduras	3,3 miligramas por mililitro (mg/mL)	20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 300 segundos (s)	100%	Suspensões de cepas de <i>Candida albicans</i> isoladas de saliva e cepas padrão
Prestes (2007)	Bolores e leveduras	0,5; 1,0 e 1,5 mg/L	1 minuto	Redução efetiva na população	Alface americana e cressa, rúcula e agrião
Selma et al. (2007)	Bactéria	1,6 e 2,2 PPM	1 minuto	3,7 e 5,6 log (UFC/mL)	Alface
Lanita e Silva (2008)	Bolores e leveduras	0,03 PPM 11°C/umidade relativa 80-85%	60 dias	2,8 para 9,0 UFC/cm em contagem	Queijo parmesão
Huth et al. (2009)	Bactérias e leveduras planctônicas; biofilme mono-espécie	1,25 a 20 microgramas por mililitro (µg/mL)	1 minuto-culturas planctônicas – 10 minutos – biofilme	5 µg/mL de ozônio aquoso eficaz para células planctônicas 20 µg/mL eficaz para biofilme	Canais radiculares de dentes
Bialoszewski et al. (2011)	Biofilmes de bactérias	1,2 - 3,6 µg/mL	Menos de 30 s	Queda brusca de células viáveis	Cepas clínicas de <i>Staphylococcus aureus</i> e

					<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Case et al. (2012)	Biofilme mono-espécie de bactéria	140 PPM	120 segundos	Ineficaz na eliminação total do biofilme, porém útil como adjuvante na desinfecção	Canais radiculares de dentes extraídos
Sadatullah, Mohamed e Razak (2012)	Bactérias e levedura	0,1 PPM	20 minutos de ozonização/ 30 segundos de exposição ao ozônio	Redução da carga de bactérias	Placa supragengival de dois dentes superiores
Katti e Chava (2013)	Bactérias anaeróbias gram-negativas	2,40 gm/Litro.	40 segundos (três vezes na semana, durante duas semanas)	<i>Eficaz na redução das bactérias Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum</i>	Tecido periodontal de pacientes com periodontite crônica
Nogales et al. (2014)	Bactérias gram-positivas/gram-negativas	2 µg/mL 5 µg/mL 8 µg/mL	1 minuto	Inibição total do crescimento na concentração de 8µg/mL de ozônio	Suspensões de cepas ATCC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; e <i>Enterococcus faecalis</i>
Al-Saad et al. (2015)	Biofilmes e células planctônicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	0,1 mg / minuto	15 a 360 minutos	Redução de 99% de células planctônicas em 15 minutos de exposição. Erradicação total do biofilme em 360 minutos de exposição.	Suspensões de 1 × 10 ⁹ CFU/mL de <i>S. aureus</i> e Biofilme de <i>S. aureus</i> em discos de liga de titânio

Observa-se que não há uma uniformidade de protocolos de aplicação do ozônio quanto à concentração, tempo de exposição, forma de aplicação, tipo de equipamento, nem tampouco, para que fins sejam destinados. Mesmo assim, em termos gerais, a ação antimicrobiana é demonstrada nestas pesquisas.

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O uso de dispositivos protéticos como aparelhos ortodônticos, próteses provisórias e próteses faciais pode promover o acúmulo de biofilme e conseqüentemente aumentar a incidência de doenças fúngicas e bacterianas. Recursos de desinfecção mostram-se, muitas vezes, inativos contra micro-organismos, sejam como células planctônicas ou em biofilme. Além disso, a utilização diária de produtos químicos desinfetantes, ou a adoção de processos físicos de eliminação microbiana, podem danificar os recursos materiais que constituem as próteses faciais, próteses provisórias e aparelhos ortodônticos.

Neste contexto, o ozônio combinado com água é um desinfetante promissor a ser utilizado na prática odontológica, uma vez que se constitui como um processo rápido, de fácil execução e baixo custo. Adicionalmente, a escassez de pesquisas com protocolos padronizados, para utilização de água ozonizada como desinfetante, justifica este trabalho.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Avaliar, *in vitro*, o efeito da água ozonizada sobre propriedades mecânicas e microbiológicas dos materiais utilizados para confecção de próteses odontológicas.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ação antimicrobiana da água ozonizada sobre a viabilidade celular de biofilmes maduros mono espécies de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus aureus*, formados sobre resina acrílica ativada quimicamente – RAAQ de próteses provisórias e aparelhos ortodônticos e silicone de próteses bucomaxilofaciais;
- Comparar os efeitos inibitórios da água ozonizada e do gluconato de clorexidina, sobre a viabilidade celular de biofilmes maduros mono espécies formados em resina acrílica ativada quimicamente – RAAQ de próteses provisórias e aparelhos ortodônticos e silicones de próteses bucomaxilofaciais;
- Comparar o efeito da água ozonizada com o gluconato de clorexidina sobre a resistência flexural da resina acrílica ativada quimicamente – RAAQ, utilizada na confecção de próteses provisórias e aparelhos ortodônticos;
- Comparar a dureza SHORE A do silicone MDX4-4210 incolor – usado na confecção de próteses bucomaxilofaciais – em quatro períodos distintos: imediato à confecção, após armazenagem por 30 dias em água destilada, 30 dias de tratamento com água ozonizada e 30 dias de tratamento com gluconato de clorexidina.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram realizados em três locais distintos, conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Local dos experimentos.

Local dos experimentos	Experimento realizado
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) Laboratório e Microbiologia do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.	Ensaio Microbiológicos
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (UNESP) Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil .	Microfotografias em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)
Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP) Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, São Paulo, Brasil.	Confecção dos corpos de prova de resina e silicone/ Testes de Resistência Flexural e Dureza

Fonte: Do autor

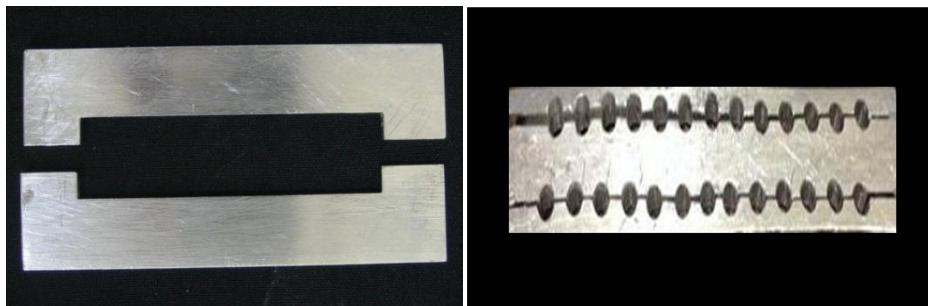
5.2 Confecção dos corpos de prova

Nesta pesquisa foram confeccionados 66 corpos de prova de RAAQ (JET[®], Clássico), utilizada para confecção de aparelhos ortodônticos de resina e próteses provisórias, e 156 corpos de prova de silicone (MDX4-4210, *Dow Corning Corporation*), para confecção de próteses bucomaxilofaciais.

5.2.1 Corpos de prova de resina

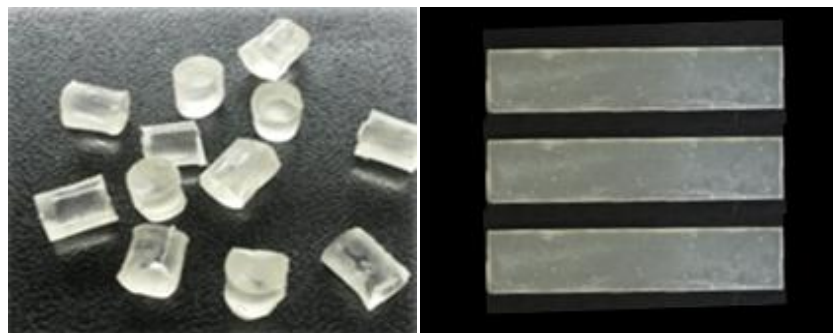
Os corpos de prova de RAAQ foram confeccionados mediante as normas da *American Dental Association – ADA (1975)*, de acordo com a especificação nº 12. Para realização dos ensaios microbiológicos, foram confeccionados 36 corpos de prova no formato circular e 30 no formato retangular para o teste de resistência flexural. Utilizou-se a resina acrílica ativada quimicamente, incolor (JET[®], Clássico, Produtos Odontológicos, São Paulo, SP), manipulado de acordo com as normas do fabricante. Uma matriz metálica circular e outra retangular (Figura 3) foram necessárias para confecção dos corpos de prova. Seguiu-se a técnica de polimerização sobre pressão de 40 Libras, sem água, por 5 minutos em panela elétrica semiautomática (Metal Vander[®], Piracicaba, SP). Finalizada a confecção de todos os corpos de prova (Figura 4), apenas os de formato circular, destinados aos ensaios microbiológicos, foram submetidos à esterilização por óxido de etileno (OXIMED, São José do Rio Preto, SP).

Figura 3 – Matriz metálica retangular e matriz metálica circular para confecção dos corpos de prova de resina.



Fonte: Do autor .

Figura 4 – Corpos de prova de resina: circulares e retangulares.

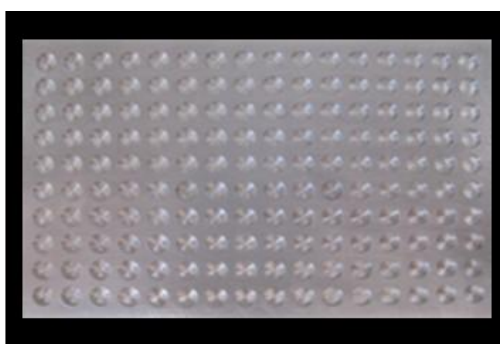


Fonte: Do autor.

5.2.2 Corpos de prova de silicone

Foram confeccionados no total, 156 corpos de prova de silicone, todos no formato circular de acordo com especificações D 2240 da Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM) (1988). Uma matriz metálica em alumínio, com 180 compartimentos circulares de 5 milímetros (mm) de diâmetro e 2 mm de espessura, foi utilizada para confecção dos corpos de prova (Figura 5).

Figura 5 – Matriz metálica para confecção dos corpos de prova de silicone.



Fonte: Do autor.

Para a confecção destes corpos de prova, utilizou-se o silicone MDX4-4210 (*Dow Corning Corporation*, MI, EUA) incolor e pigmentado (médio e escuro), manuseado de acordo com as instruções do fabricante, em temperatura ambiente de $23 \pm 25^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $50 \pm 10\%$. O silicone e os pigmentos foram pesados em balança digital, misturados e inseridos na matriz metálica, onde permaneceram confinados, com a superfície externa exposta ao meio ambiente durante três dias, para a completa polimerização do material. Decorrido este período, os corpos de prova foram removidos da matriz (Figura 6) com auxílio de um instrumento de ponta fina, e posteriormente, apenas aqueles destinados ao ensaio microbiológico foram conduzidos à esterilização por óxido de etileno (OXIMED, São José do Rio Preto, SP). A caracterização do silicone incolor e dos pigmentos utilizados para confecção dos corpos de prova, está representada no quadro 3.

Quadro 3 – Caracterização do silicone incolor e dos pigmentos utilizados para confecção dos corpos de prova.

MATERIAL	FABRICANTE	PIGMENTADO OU NÃO	LOTE
MDX4-4210 (Polidimetilsiloxano)	Dow Corning Corporation, Midland, Mich	Incolor	0007491879
Functional Intrinsic II - Silicone Coloring System	Factor II Inc, Lakeside, Ariz	Tonalidade média (Tan FI – 215)	B 042811
Functional Intrinsic II - Silicone Coloring System	Factor II Inc	Tonalidade escura (Black FI – 205)	SB 041411

Figura 6 – Corpos de prova de silicone incolor e pigmentado (médio e preto).



Fonte: Do autor

5.3 Produção da água ozonizada

O Gerador de ozônio (OZONLIFE[®]) foi utilizado nesta pesquisa, com capacidade de produção de 0,3 gramas de ozônio por hora (g/h), e foi acoplado a um gerador de oxigênio (modelo *ever flo* – White Martins[®]), com vazão de 1 Litro por Minuto (LPM). O ozônio neste sistema foi gerado pela ação de corrente elétrica sobre as moléculas de oxigênio de alta pureza, fornecido pelo gerador de oxigênio.

Utilizou-se 100 mililitros (mL) de água destilada estéril (25°C), colocados em um béquer (estéril). Uma mangueira de silicone, com uma pedra porosa em uma das extremidades foi conectada ao gerador de ozônio, e colocada em contato com a água promovendo um sistema difusor de bolhas finas. Este sistema permaneceu ligado por 15 minutos, com o objetivo de ozonizar a água.

5.4 Mensuração do ozônio.

Após os 15 minutos de ozonização, a concentração final do ozônio na água – residual de ozônio – foi monitorada, com o auxílio de um conjunto colorimétrico *CHEMets*[®] *KIT Ozone* (K-7404), seguindo-se a instrução do fabricante, Figura 7.

Figura 7 – Conjunto colorimétrico *CHEMets*[®] *KIT Ozone* (K-7404).



Fonte: Do autor

5.5 Obtenção das cepas microbianas

Os grupos microbianos de investigação foram constituídos por cepas padrões da coleção americana – *American Type Culture Collection* (ATCC) conforme descrição a seguir: *Candida albicans* (90028), *Candida parapsilosis* (22019) e *Staphylococcus aureus* (25923). Para que as cepas fossem reativadas, as mesmas foram retiradas do freezer (Sanyo[®], modelo MDF-U53VC) – 80°C, semeadas em caldo *Sabouraud* e caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) respectivamente, e incubadas a 35°C, por 48 horas. Posteriormente, as leveduras foram repicadas em placas de *Ágar Sabouraud* (AS) e mantidas em estufa de 30°C, por 48 horas. Para bactéria, a semeadura ocorreu em *Ágar BHI*, com incubação a 35°C, por 24 horas.

5.6 Formação do biofilme

A formação do biofilme foi realizada segundo os protocolos descritos por Peeters, Nelis e Coenye (2008) e Pitangui et al. (2012), com modificações estabelecidas quanto à sua inclusão nos corpos de prova (resina e silicone).

Inicialmente, suspensões com 5 mL de salina estéril a 0,9% foram preparadas com as cepas de micro-organismos obtendo-se uma suspensão de 5×10^7 ou 10^8 UFC/mL – escala 4 de *MacFarland* para levedura e escala 2 para bactéria.

Os corpos de prova de resina e silicone foram distribuídos em microplacas estéreis, de fundo plano contendo 96 poços (α Alfa[®], Ipiranga – SP, Brasil). A distribuição ocorreu na proporção de 4 corpos de prova de resina e 4 de silicone para cada micro-organismo. Foram incorporados 100 microlitros (μ l) de cada inóculo (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *S. aureus*), seguido de incubação e agitação constante em *shaker* (80 rotações por minuto – rpm) a 37°C por 2 horas, para pré-adesão do biofilme. Decorridas 2 horas, os inóculos foram retirados com adição subsequente de 100 μ L do meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) com dextrose (SIGMA[®]). Nova incubação sob as mesmas condições foi estabelecida e mantida por 48 horas a 37°C, com meio de cultura trocado a cada 24 horas. Decorrido o tempo pré-estabelecido, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente, e os poços contendo os corpos de prova de resina e silicone foram lavados três vezes com 200 μ L de salina estéril, 0,9%. Para o meio de cultura utilizado e soluções (RPMI, PBS e Salina) utilizou-se controle de esterilidade e para os micro-organismos, controle de crescimento.

5.7 Análise da viabilidade celular

Uma alíquota da água destilada ozonizada (200 μ L) foi transferida para microplaca contendo os corpos de prova de resina e silicone com os biofilmes pelas espécies microbianas. Três tempos de exposição da água ozonizada foram considerados: 2, 5 e 10 minutos. Decorridos os tempos, a água ozonizada foi retirada de cada poço e 50 μ L de XTT (SIGMA[®]) – 1 mg/mL em PBS e 4 μ L de Menadiona (SIGMA[®]) – 1 mM em Etanol, foram inoculados, com incubação a 37°C por 4 horas sob agitação constante de 80 rpm. Findo este tempo, os corpos de prova foram retirados e as placas seguiram para leitura espectrofotométrica em

leitor de ELISA (Labtec[®], LT4000). A viabilidade celular foi mensurada com valores de absorvância (DO 492 nm) e comparada com os controles positivos e negativos.

A solução de gluconato de clorexidina (2% e 4 %) foi utilizada como padrão de atividade inibitória, a ser comparado com a da água ozonizada, obedecendo aos critérios metodológicos utilizados nesta pesquisa.

5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta análise iniciou-se com a fixação dos corpos de prova em glutaraldeído, mantidos por 48 horas. Em seguida, os mesmos foram tratados com solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em tampão fosfato 0,1 Molar (M), por 12 horas. A desidratação em etanol foi estabelecida com concentrações crescentes (50%, 60%, 70%, 90% e 100%), realizadas com intervalos de 20 minutos. Posteriormente foi realizada a secagem em ponto crítico, por 40 minutos, no equipamento MS *Electron Microscopy*[®], modelo 850. Logo após, foi realizado o processo de metalização, que ocorreu no aparelho *Denton Vacuum*[®], modelo Desk II, por sublimação em ouro durante 150 segundos. Findo este processo, as amostras foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL *Sciences*[®], modelo JSM-5410, para análise.

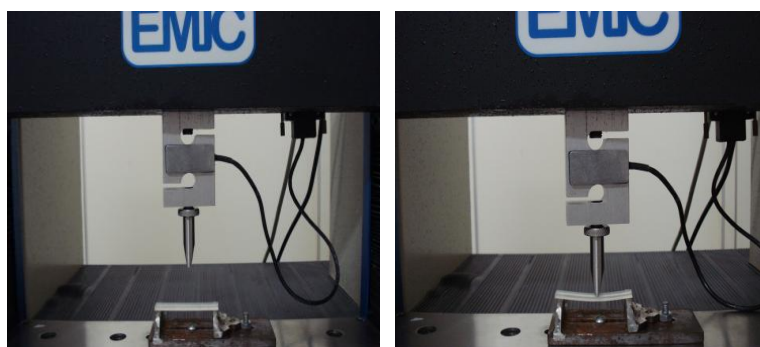
5.9 Teste de resistência flexural – resinas

Este ensaio ocorreu em duas etapas e foi realizado com o objetivo de avaliar a resistência flexural da resina entre dois tipos de tratamento: água ozonizada e gluconato de clorexidina 2%.

Os corpos de prova retangulares foram subdivididos em dois grupos (n = 10) conforme as soluções utilizadas para tratamento/desinfecção: grupo água ozonizada (30 mL de 100 mL de água destilada ozonizada a 1,00 PPM-mg/l por 15 minutos) e gluconato de clorexidina (2%). O tratamento foi estabelecido a partir de uma ciclagem de 30 dias com a imersão dos corpos de prova nas soluções de tratamento, por 10 minutos, uma vez ao dia. Findos os 10 minutos de tratamento, os corpos de prova foram mantidos em recipientes fechados contendo saliva artificial e incubados em estufa a 37°C.

Ao finalizar a ciclagem de 30 dias, os corpos de prova seguiram aos testes de resistência flexural, realizados na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Odontologia-Araçatuba/SP. Para este teste utilizou-se a Máquina de Ensaio Universal (EMIC[®], DL3000) (Figura 5), calibrada em velocidade de 5 mm por segundo. Para tanto, os corpos de prova foram posicionados sobre suporte metálico contendo dois pontos de sustentação, aplicando-se força axial e equidistante aos dois outros pontos até a ruptura do corpo de prova, com registro do valor necessário para quebra em Newton (N) (Figura 8). O cálculo da resistência flexural foi determinado pela fórmula $s = \frac{3Fl}{2bh^2}$, onde s corresponde à resistência flexural em MPa, F é a força máxima exercida sobre a amostra em Newtons, l é a distância entre os suportes (em mm), b a largura da amostra (em mm) e h a altura do corpo de prova (em mm).

Figura 8 – Máquina de Ensaio Universal de Resistência Flexural – EMIC[®] DL3000



Fonte: Oliveira, 2011.

5.10 Teste de dureza – silicones

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a dureza dos três grupos de silicone (incolor, médio e preto) em quatro períodos distintos: recém-confeccionado (imediate); armazenado por 30 dias em água destilada (sem tratamento), tratado durante 30 dias com água ozonizada e durante 30 dias com gluconato de clorexidina – 4%.

Para o ensaio com água ozonizada, 30 corpos de prova de silicone no formato circular foram divididos em três grupos, de acordo com a pigmentação ou não: incolor ($n = 10$), médio ($n = 10$), preto ($n = 10$), e submetidos ao tratamento com água ozonizada, uma vez ao dia, por 10 minutos, durante trinta dias consecutivos. Neste sentido, 100 mL de água destilada foram ozonizados por 15 minutos e em seguida distribuídos num volume de 30 mL para cada um

dos três recipientes (divididos em três grupos: incolor, médio e preto), nos quais os corpos de prova foram submersos e mantidos durante o tempo de tratamento estabelecido. Ao término, os mesmos foram retirados, colocados em novos recipientes contendo água destilada e colocados em estufa de 35-36 °C, onde permaneceram até o próximo ensaio. Finalizada a ciclagem de 30 dias, os corpos de prova foram encaminhados para o teste de dureza. Paralelamente, para os outros dois períodos (imediate e 30 dias de armazenagem em água destilada), ocorreram métodos distintos de avaliação: ao primeiro, assim que confeccionados, os corpos de prova incolor (n = 10), médio (n = 10) e preto (n = 10), seguiram para os testes de dureza; ao segundo, os corpos de prova incolor (n = 10), médio (n = 10) e preto (n = 10) foram mantidos em água destilada por 30 dias, seguindo os mesmos ensaios de dureza. Para o ensaio com a solução de gluconato de clorexidina os mesmos parâmetros foram adotados.

Para o teste de dureza foi utilizado o Durômetro Digital Teclock® (Woltest), modelo GSD 709) com um suporte, desenvolvido para facilitar a medição em série, eliminando erros de carga e a aplicação não vertical do durômetro, com garantia de uma perfeita uniformidade nos ensaios (Figura 9).

Figura 9 – Durômetro Digital Teclock® – Woltest com suporte.



Fonte: Guiotti (2010).

O teste de dureza com os corpos de prova de silicone, realizado no durômetro Teclock®, ocorreram de acordo com a especificação D 2240 da *American Society for Testing and Materials* (ASTM) (1988). Este método baseia-se na penetração de uma agulha sobre a superfície do material com uma carga constante de 10 N (para a Dureza SHORE A, o peso de 1 Quilograma (Kg) já é fixo no suporte). Os valores de dureza são expressos em unidade SHORE A, sendo que a faixa de ensaio está compreendida entre 0 a 100 SHORE, com tolerância de mais ou menos (\pm) 1%. A dureza é inversamente proporcional à penetração da

agulha, ou seja, quanto maior a penetração, menor o valor indicado na escala (GUIOTTI, 2006).

Para efetuar a medição, cada corpo de prova foi posicionado na mesa do suporte do durômetro, mantendo uma distância de ± 2 mm da ponta penetradora. A alavanca do suporte foi acionada, elevando a mesa contendo o corpo de prova contra a ponta penetradora (Figura 9). Para que as leituras fossem precisas, efetuaram-se três medições no sentido do diâmetro de cada amostra, sendo o mesmo deslocado o suficiente para que não ocorressem diversas perfurações no mesmo ponto (GUIOTTI, 2006). Cada leitura foi executada após 1 segundo de contato entre a ponta analisadora e o material (KAZANJI; WATKINSON, 1988) com carga constante de 1 Quilograma-força (Kgf) (KIAT-AMNUAY et al., 2005), obtendo assim um valor médio da dureza SHORE A.

5.11 Análise Estatística

Após a coleta dos dados de resistência flexural e dureza, os mesmos foram planilhados e submetidos à análise estatística descritiva, a partir dos cálculos de medida de tendência central e dispersão. Em seguida, foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, para verificação da normalidade dos mesmos.

Os dados de dureza do silicone obtidos foram comparados utilizando-se o teste de ANOVA, com teste de Tukey *post hoc*.

As comparações dos valores de resistência flexural obtidos após os tratamentos com água ozonizada e gluconato de clorexidina foram analisadas com o teste T de *Student*

Em todas as análises foi adotado um nível de significância de 5%. O programa utilizado foi o SPSS 23.0 (IBM, Armonk, Nova Iorque, EUA).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Mensuração do ozônio

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos após a mensuração do residual de O₃. Foi possível observar que a concentração de ozônio residual foi de 1,0 PPM-mg/L.

Tabela 3 – Valor do residual de O₃ obtido nos experimentos.

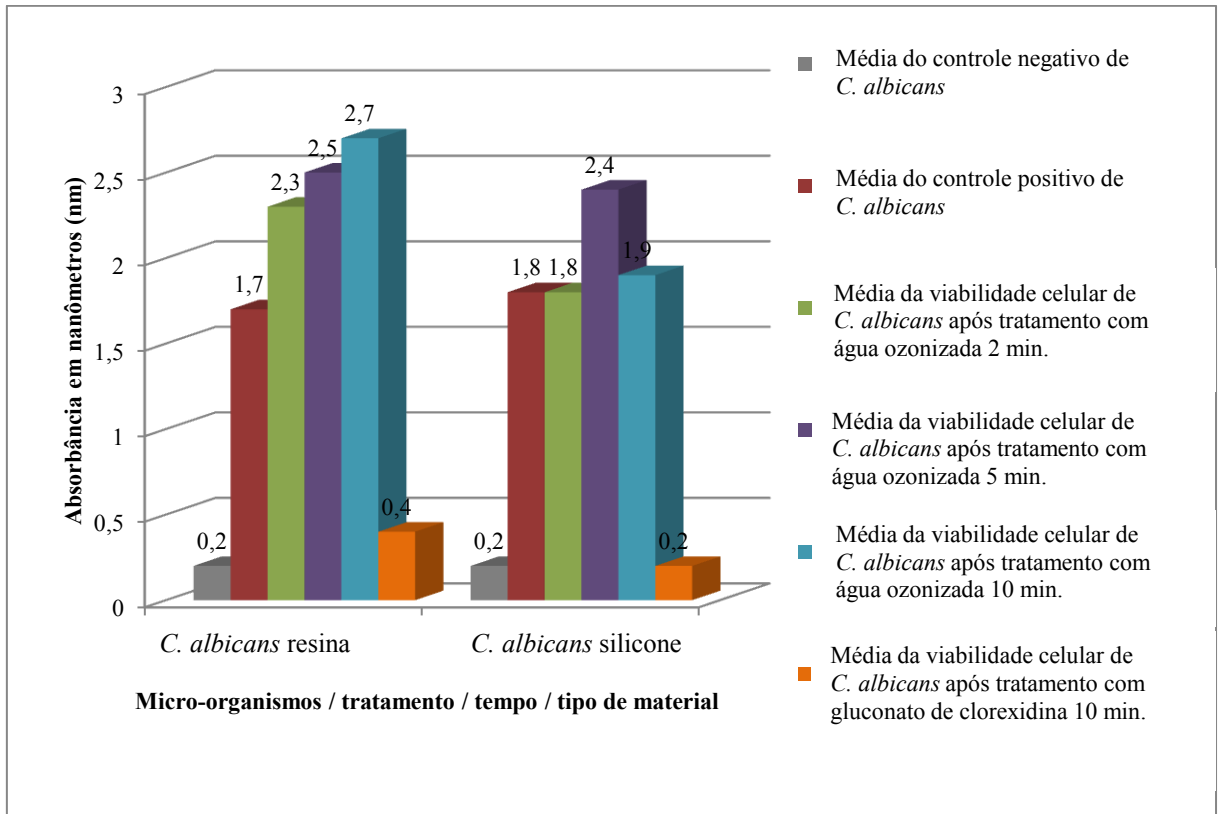
Experimentos	Residual de ozônio – O ₃ (PPM-mg/L)
Ensaio microbiológico e Testes Físicos	1,0 PPM-mg/L

6.2 Análise da viabilidade celular

Os valores de absorvância obtidos pós-adição do XTT foram registrados segundo dados de interferência sobre a viabilidade celular de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *S. aureus* em biofilme (Figuras 10, 11 e 12). Registros das análises, nos três tempos estabelecidos (2, 5 e 10 minutos), foram feitos incluindo-se os controles positivos e negativos, obtidos a partir das médias dos valores de absorvância.

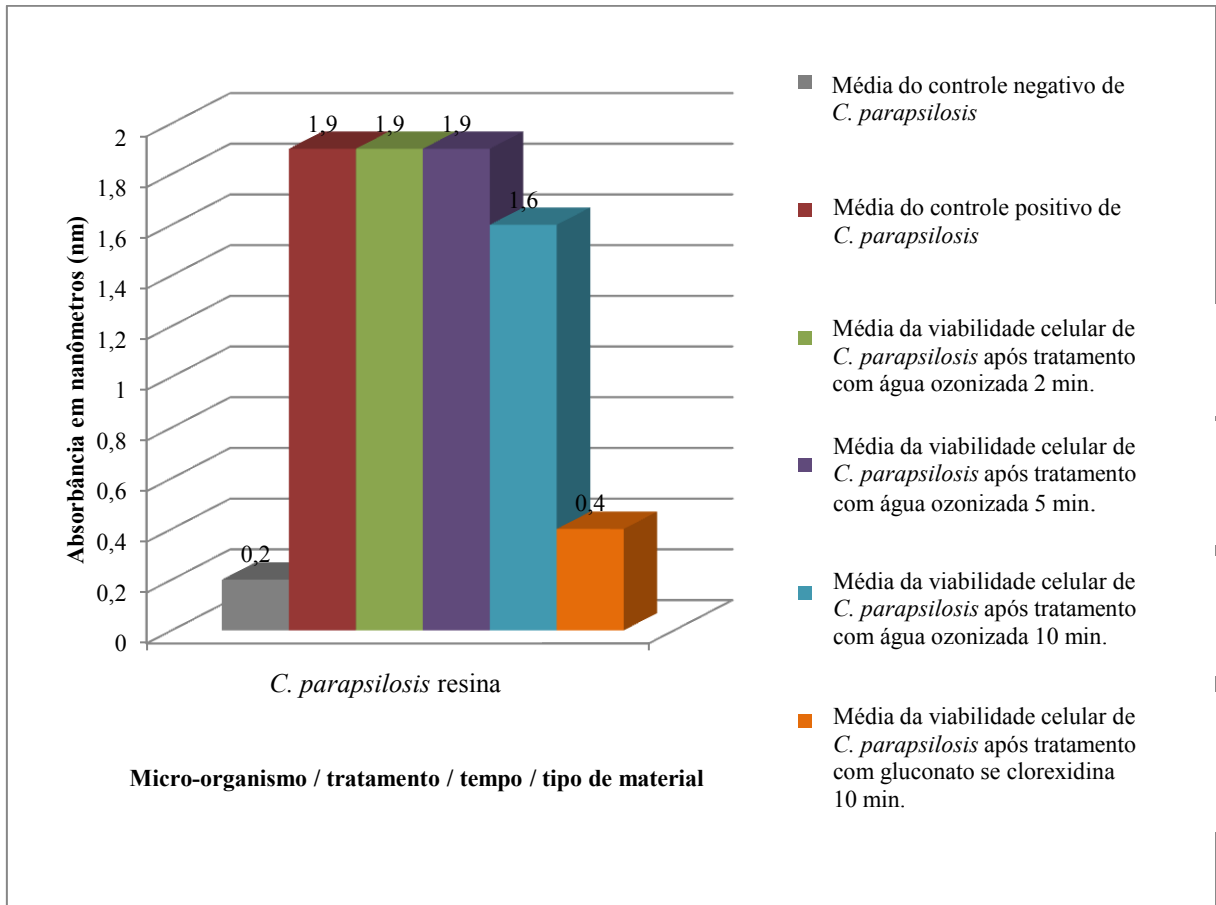
A Figura 10 reporta a viabilidade celular das células de *C. albicans* em biofilme formado sobre os dois materiais odontológicos, após tratamento com água ozonizada. Foi possível notar que, não houve redução da viabilidade celular para nenhum dos dois tipos de corpos de prova, nem tampouco para os tempos de tratamento com água ozonizada, em comparação com o controle positivo. As médias de valores de absorvância de viabilidade celular, após tratamento de resina e silicone com gluconato de clorexidina foram menores quando comparadas aos dos controles positivos. A média de viabilidade de *C. albicans* em silicone, particularmente, foi igual à média do controle negativo, mostrando que a solução de gluconato de clorexidina teve ação antimicrobiana superior à água ozonizada.

Figura 10 – Gráfico representativo dos valores médios de viabilidade celular (absorbância) de *C. albicans* em biofilme sobre resinas e silicones tratados com água ozonizada (2, 5 e 10 minutos) e gluconato de clorexidina (10 minutos), com respectivos controles positivos e negativos. Valores de absorbância obtidos em 492 nm.



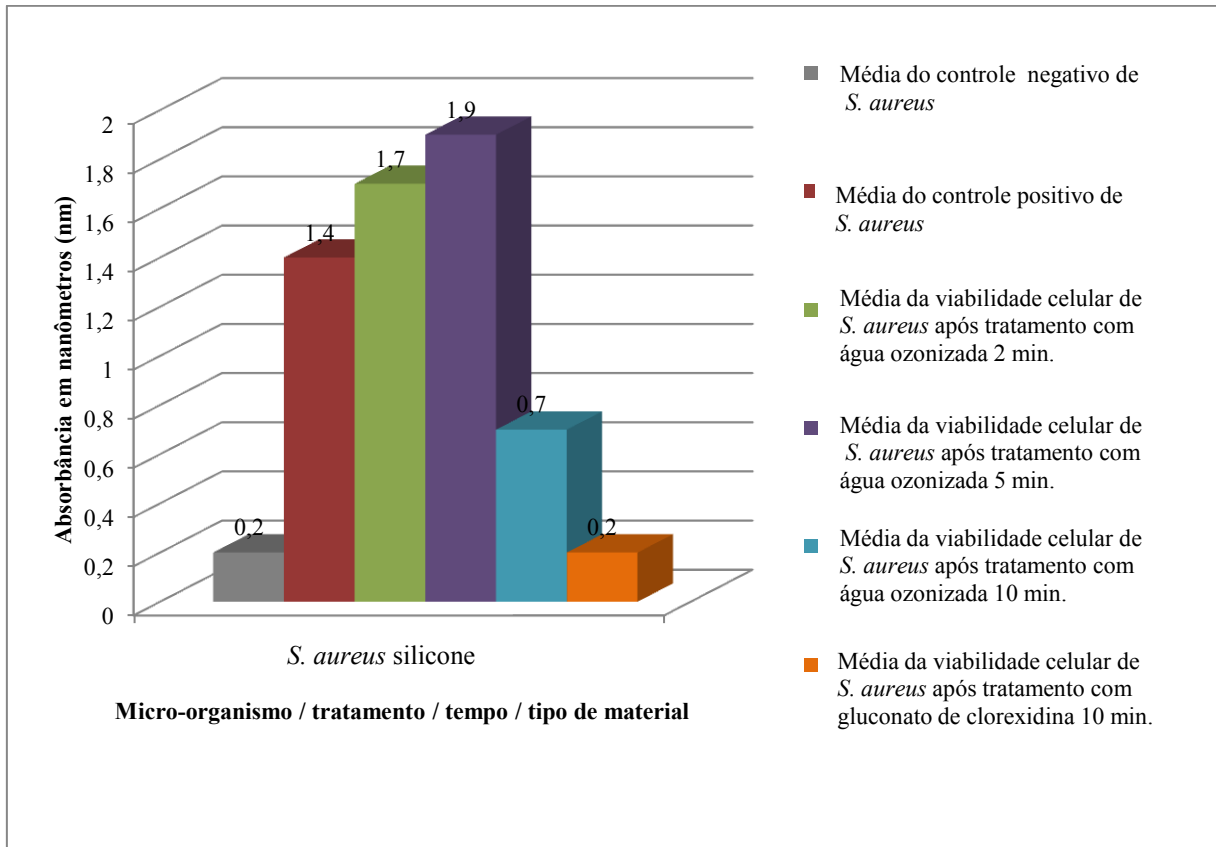
Na Figura 11, o gráfico representa as médias de viabilidade celular de *C. parapsilosis* em biofilme sobre resina, após tratamento com água ozonizada. Notou-se que, quando o tratamento com água ozonizada foi mantido por 2 e 5 minutos, a viabilidade celular foi igual ao controle positivo, diferindo apenas para o tempo de 10 minutos de exposição. A ação inibitória foi expressiva quando os corpos de prova foram tratados com gluconato de clorexidina, porém com registro da inabilidade de erradicar os micro-organismos.

Figura 11 – Gráfico representativo dos valores médios de viabilidade celular (absorbância) de *C. parapsilosis* em biofilme sobre resinas tratadas com água ozonizada (2, 5 e 10 minutos) e gluconato de clorexidina (10 minutos), e respectivos controles positivos e negativos. Valores de absorbância obtidos em 492 nm.



A Figura 12 apresenta por meio do gráfico, os valores de viabilidade celular de *S. aureus* em biofilme sobre silicone, após tratamento com água ozonizada, e respectivos controles. Constatou-se com esta análise, à exceção do tempo de 10 minutos, a viabilidade celular foi sempre maior se comparada ao controle positivo. No entanto, com gluconato de clorexidina, observou-se uma equivalência sobre ação inibitória com controle negativo.

Figura 12 – Gráfico representativo dos valores médios de viabilidade celular (absorbância) de *S. aureus* em biofilme sobre silicones tratados com água ozonizada (2, 5 e 10 minutos) e gluconato de clorexidina (10 minutos), e respectivos controles positivos e negativos. Valores de absorbância obtidos em 492 nm.



6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As Figuras 13 e 14 demonstram a superfície da resina e silicone dos grupos controles (*C. albicans*) e tratados pela água ozonizada nos tempos 2, 5 e 10 minutos. Além disso, frente à resina, observaram-se irregularidades na superfície. Foi possível observar, independentemente dos tempos de tratamento, a presença de células individuais ou em biofilme sobre as superfícies dos corpos de prova. Após análise criteriosa das imagens contidas na Figura 14, observa-se a estruturação de células em biofilme em resinas para os tempos 2, 5 e 10 minutos de tratamento, com crescente complexidade de acordo com o tempo. No entanto, com silicone, ocorreu aglomeração mais complexa de microrganismos, apenas para o tempo de 5 minutos. Estes eventos foram compatíveis com a análise da viabilidade celular em XTT.

Figura 13 – Fotomicrografias da superfície de resina e silicone, obtidas por MEV – A – Controle negativo resina; B – Controle positivo resina *C. albicans*; C – Controle negativo silicone; D – Controle positivo silicone *C. albicans*.

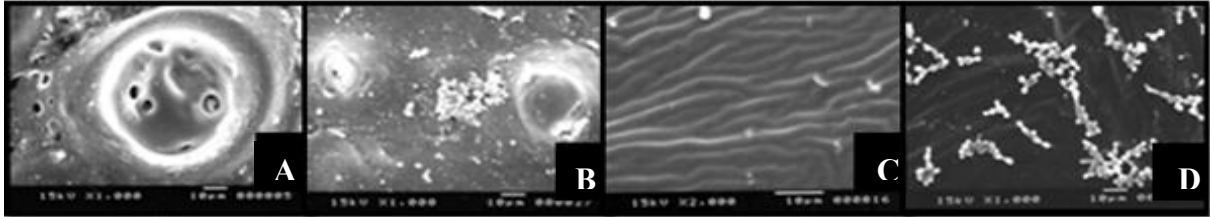
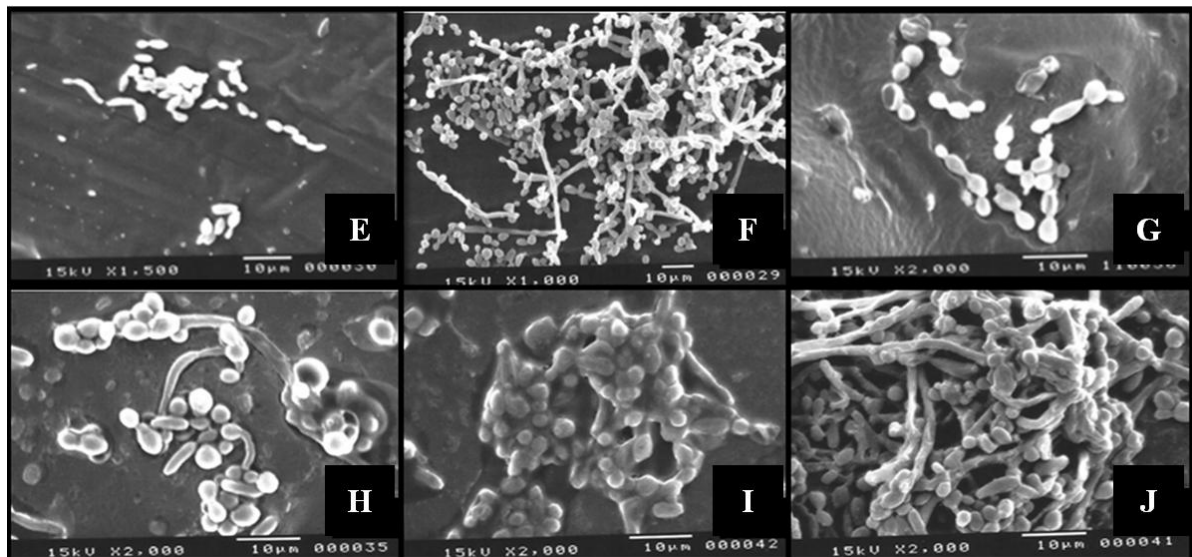


Figura 14 – Fotomicrografias da superfície de silicone e resina, obtidas por MEV – E, F e G – Superfície de silicone com biofilme de *C. albicans*, tratada com água ozonizada por 2, 5 e 10 min., respectivamente. H, I e J – Superfície de resina com biofilme de *C. albicans*, tratada com água ozonizada por 2, 5 e 10 min., respectivamente.



As Figuras 15 e 16 demonstram a superfície da resina dos grupos controles (*C. parapsilosis*) e tratados pela água ozonizada nos tempos 2, 5 e 10 minutos. Foi possível observar que o tratamento com água ozonizada não erradicou o biofilme de *C. parapsilosis*, independentemente dos tempos de tratamento. Adicionalmente, com o aumento do tempo de tratamento, foi possível observar pelas imagens, uma redução da carga microbiana, Figura 11. Novamente, estes eventos foram compatíveis com a análise da viabilidade celular em XTT, especialmente para o último tempo de tratamento.

Figura 15 – Fotomicrografias da superfície de resina, obtidas por MEV– A – Controle negativo resina; B – Controle positivo resina *C. parapsilosis*.

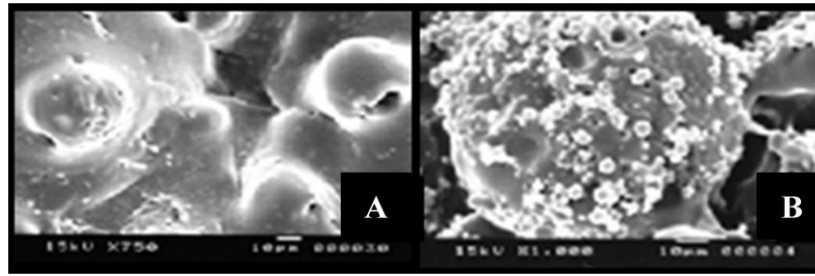
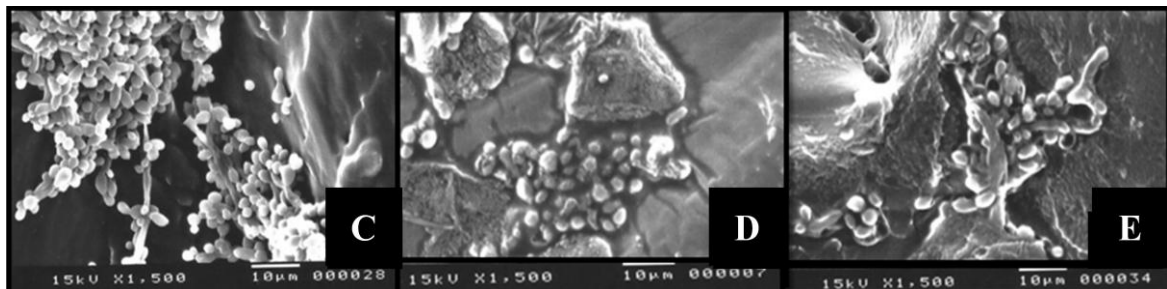


Figura 16 – Fotomicrografias da superfície de resina, obtidas por MEV – C, D e E – Superfície de resina com biofilme de *C. parapsilosis*, tratada com água ozonizada por 2, 5 e 10 min, respectivamente.



Nas Figuras 17 e 18 observa-se a superfície do silicone dos grupos controles (*S. aureus*) e tratados com água ozonizada nos tempos 2, 5 e 10 minutos. Constatou-se que, células individuais ou em biofilme mantiveram-se sobre as superfícies dos corpos de prova. Não ocorreu erradicação desta espécie bacteriana em nenhum dos tempos de tratamento. Porém, variações quanto à complexidade do biofilme ocorreram entre os grupos, com correspondência aos testes de viabilidade celular.

Figura 17 – Fotomicrografias da superfície de silicone, obtidas por MEV – A – Controle negativo silicone; B – Controle positivo silicone *S. aureus*.

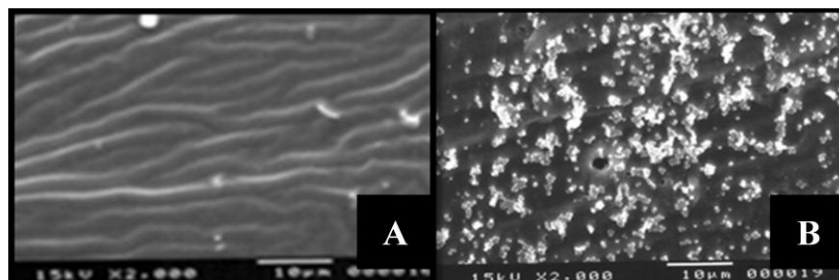
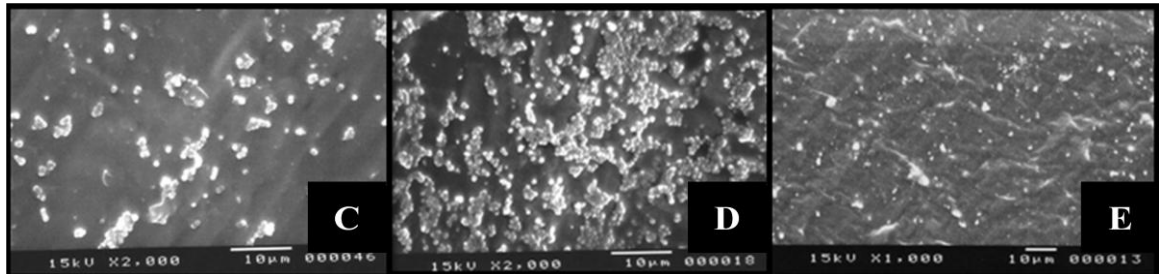


Figura 18 – Fotomicrografias da superfície de silicone, obtidas por MEV – C, D e E – Superfície de silicone com biofilme de *S. aureus*, tratada com água ozonizada por 2, 5 e 10 min, respectivamente.



A Figura 19 apresenta a imagem obtida por MEV, de biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis* sobre a superfície de resina após tratamento de 10 minutos com solução de gluconato de clorexidina. Notou-se a inatividade deste composto em eliminar as células microbianas, porém, com estruturação mais simples, de forma mais isolada. Adicionalmente, este tratamento promoveu uma alteração da superfície dos corpos de prova, revelando aparência rugosa. Com relação aos corpos de prova de silicone, este evento foi comum ao anterior, Figura 20. Os resultados destas imagens, comparados à análise com XTT demonstram que as células apresentaram redução na viabilidade, apesar de mantidas na superfície. Valorizando-se o experimento com silicone, observou-se que as espécies de *C. albicans* e *S. aureus*, continuaram ligadas à superfície dos corpos de prova, porém com viabilidade nula, ou seja, equivalente ao controle negativo.

Figura 19 – Fotomicrografias da superfície de resina, obtidas por MEV – A e B – Superfície de resina com biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, respectivamente, tratadas com Gluconato de clorexidina por 10 min.

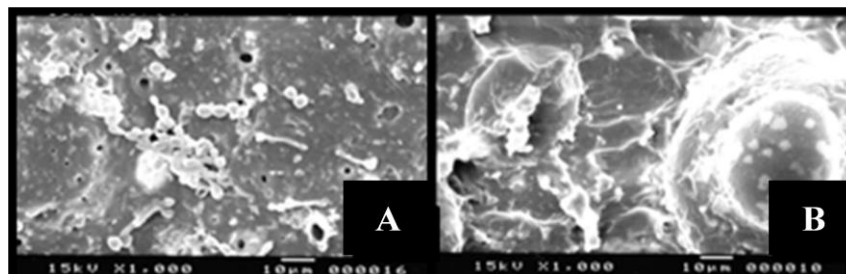
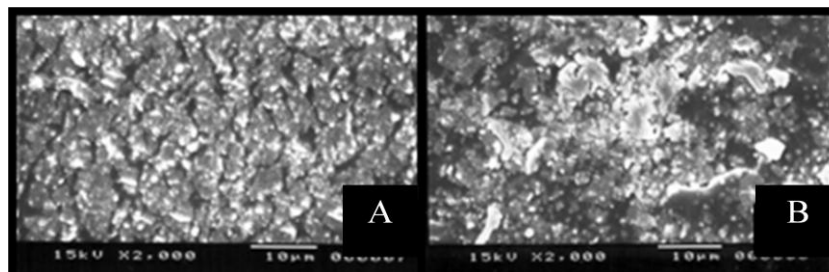


Figura 20 – Fotomicrografias da superfície de silicone, obtidas por MEV – A e B – Superfície de silicone com biofilme de *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente, tratada com gluconato de clorexidina por 10 min.



6.4 Teste de resistência flexural – resinas

6.4.1 Teste de resistência flexural após tratamento com água ozonizada e gluconato de clorexidina.

A Tabela 4 mostra que ao aplicar o teste T para comparar as médias dos valores de resistência flexural entre os grupos de tratamento – água ozonizada e gluconato de clorexidina – constatou-se que não houve diferença com significância estatística, $P > 0,05$ (Tabela 4). Isso sugere que não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos sobre as propriedades físicas da resina.

Tabela 4 – Valores médios da Resistência Flexural (MPa) e desvio padrão (dp) após tratamento com água ozonizada (10 minutos, uma vez ao dia, durante 30 dias) e gluconato de clorexidina (10 minutos, uma vez ao dia, durante 30 dias).

Nº de amostras	Média da Resistência Flexural (MPa) e Desvio padrão (Tratamento água ozonizada)	Média da Resistência Flexural (MPa) e Desvio padrão (Tratamento gluconato de clorexidina)
30	51,61 (4,59 dp)	50,22 (5,91 dp)

Nota: $P > 0,05$, pelo teste T.

6.5 Teste de dureza – silicones

6.5.1 Teste de dureza após tratamento com água ozonizada

As médias dos valores de dureza revelaram que os períodos de 30 dias de armazenagem em água destilada e 30 dias de tratamento com água ozonizada exerceram influência sobre o silicone, com um aumento da dureza. Os testes estatísticos mostraram que, independentemente do grupo de silicone (cor), quando as médias dos valores da dureza SHORE A foram comparadas entre os três períodos: imediato (26,34), armazenagem de 30 dias em água destilada (35,34) e 30 dias e desinfecção com água ozonizada (33, 75) houve diferença com significância estatística, ($P < 0,05$). Observou-se também que o período de 30 dias de tratamento com água ozonizada promoveu uma diminuição da dureza, comparado ao período de 30 dias de armazenagem em água destilada, Tabela 5.

Tabela 5 – Média geral da dureza SHORE A, independente da pigmentação do silicone, nos diferentes períodos, após desinfecção de 30 dias com água ozonizada.

Períodos	Médias da dureza SHORE A e Desvio Padrão (dp)
Imediato	26,34 A (1,33 dp)
30 dias de armazenagem em água destilada	35,34 B (1,23 dp)
30 dias de tratamento com água ozonizada	33,75 C (1,63 dp)

Nota: Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si em nível de 95% de confiabilidade ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

Na tabela 6, é possível observar que quando os grupos de silicone (com ou sem pigmento) foram comparados entre si para cada período (imediato, 30 dias de armazenagem em água destilada e 30 dias de tratamento com água ozonizada), os valores não apresentaram diferença com significância estatística, $P > 0,05$.

A mesma tabela mostra que quando os períodos (imediato, 30 dias de armazenagem em água destilada e 30 dias de tratamento com água ozonizada) foram comparados entre si, para cada grupo de silicone (com ou sem pigmento), os valores apresentaram diferença com

significância estatística ($P < 0,05$), com exceção, entre os períodos: 30 dias de armazenagem em água destilada e 30 dias de tratamento com água ozonizada para o grupo de silicone de pigmento médio ($P > 0,05$), que ao contrário, não apresentaram diferença com significância estatística.

Tabela 6 – Valores médios da dureza SHORE A de cada grupo de silicone, em função ou não da pigmentação, nos diferentes períodos, após a desinfecção de 30 dias com água ozonizada.

Grupos de Silicones	Média Imediato e Desvio Padrão (dp)	Média 30 dias de armazenagem em água destilada e Desvio Padrão (dp)	Média 30 dias de desinfecção com água ozonizada e Desvio Padrão (dp)
Grupo Incolor	26,47 Aa (0,93 dp)	34,77 Ab (0,93 dp)	32,83 Ac (2,22 dp)
Grupo Médio	25,77 Aa (1,27 dp)	35,37 Ab (1,26 dp)	34,5 Ab (1,22 dp)
Grupo Preto	26,8 Aa (1,62 dp)	35,9 Ab (1,62 dp)	33,93 Ac (1,22 dp)

Nota: Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si em nível de 95% de confiabilidade; ($p > 0,05$), pelo Teste de Tukey.

6.5.2 Teste de dureza após tratamento com gluconato de clorexidina 4%.

A Tabela 7 mostra as médias dos valores de dureza SHORE A, quando os períodos (imediato, 30 dias de armazenagem em água destilada e 30 dias de tratamento com gluconato de clorexidina a 4%) foram comparados entre si, independentemente do grupo de silicone (com ou sem pigmento), constatou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$). É possível observar que o período de 30 dias de tratamento com gluconato de clorexidina promoveu uma diminuição da dureza, comparado ao período de 30 dias de armazenagem em água destilada.

Tabela 7 – Média geral da dureza SHORE A, independente da pigmentação do silicone, nos diferentes períodos, após desinfecção de 30 dias com gluconato de clorexidina.

Períodos	Médias da dureza SHORE A e Desvio Padrão (dp)
Imediato	26,34 A (1,33 dp)
30 dias de armazenagem em água destilada	35,34 B (1,23 dp)
30 dias de tratamento com gluconato de clorexidina	32,85 C (2,98 dp)

Nota: Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si em nível de 95% confiabilidade ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

A Tabela 8 apresenta os valores médios da dureza SHORE A de cada grupo de silicone, em função ou não da pigmentação, nos diferentes períodos, após a desinfecção com gluconato de clorexidina. Observou-se que quando os grupos de silicone foram comparados entre si para cada período, não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$), à exceção do grupo médio, que apresentou diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), após 30 dias de desinfecção com gluconato de clorexidina, com um valor médio de dureza menor do que os outros grupos (incolor e preto). Além disso, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos, exceto entre de 30 dias de armazenamento em água destilada e 30 dias de desinfecção com gluconato de clorexidina para o grupo preto, que não apresentou diferença ($P > 0,05$).

Tabela 8 – Valores médios da dureza SHORE A de cada grupo de silicone, em função ou não da pigmentação, nos diferentes períodos, após a desinfecção de 30 dias com gluconato de clorexidina.

Grupos de Silicones	Média Imediato e Desvio Padrão (dp)	Média 30 dias de armazenagem em água destilada e Desvio Padrão (dp)	Média 30 dias de desinfecção com gluconato de clorexidina e Desvio Padrão (dp)
Grupo Incolor	26,46 Aa (0,93 dp)	34,77 Ab (0,93 dp)	33,08 Ac (1,94 dp)
Grupo Médio	25,77 Aa (1,27 dp)	35,37 Ab (0,85 dp)	30,3 Bc (1,76 dp)
Grupo Preto	26,8 Aa (1,62 dp)	35,9 Ab (1,62 dp)	35,19 Ab (1,22 dp)

Nota: Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si em nível de 95% de confiabilidade ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

Ao aplicar o teste T para comparar os valores médios de dureza SHORE A, independentemente do grupo de silicone (com ou sem pigmento), em relação aos tipos de desinfecção utilizados: 30 dias de tratamento com água ozonizada e 30 dias de tratamento com gluconato de clorexidina, constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa, ($P > 0,05$), Tabela 9.

Tabela 9 – Comparação entre os valores médios da dureza para os dois tipos de tratamento, água ozonizada e gluconato de clorexidina, após 30 dias, independente do grupo de silicone.

Nº de Amostras	Média Dureza 30 dias de tratamento com água ozonizada e Desvio Padrão	Média Dureza 30 dias de tratamento com gluconato de clorexidina e Desvio Padrão
30	33,75 A (1,63 dp)	32,85 A (2,98 dp)

Nota: $P > 0,05$, pelo teste T, não houve diferença estatisticamente significativa

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O gás ozônio e água ozonizada em altas concentrações têm surgido como agente antimicrobiano potencial (NAGAYOSHI et al., 2004a). O valor da concentração, aqui obtido, pode ser considerado satisfatório para atuar como antimicrobiano, uma vez que, em outros estudos, já foi demonstrada esta ação contra micro-organismos em concentrações ainda menores (SADATULLAH; MOHAMED; RAZAK, 2014).

Este estudo é pioneiro quanto à avaliação da água ozonizada e sua interferência na viabilidade celular em biofilme por *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *S. aureus*, formado sobre resina e silicone.

Considerando as variáveis de tempo, concentração do ozônio e fluxo interrompido, a ação inibitória não ocorreu conforme esperado. Os índices maiores de viabilidade celular para os grupos tratados, em comparação com os controles, indicam a instabilidade do ozônio na água, para tempo de exposição de tratamento, quando sua reposição não é refeita. Desta forma, o tratamento com fluxo interrompido não deve ser adotado como protocolo de desinfecção de resinas e silicones utilizados em odontologia.

Alguns estudos relataram que condições de alcalinidade e temperaturas maiores que 20° C podem diminuir o efeito antimicrobiano do ozônio (LANGLAIS, RECKHOW E BRINK, 1991; WICKRAMANAYAKE, 1991; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; VIDAL, 2003). Os resultados da atual pesquisa corroboram com esta afirmativa, uma vez que os registros de pH da água foram mantidos em 7,1 e a temperatura em 25°C, o que pode explicar a redução da atividade da água ozonizada.

Comparando-se a viabilidade celular entre os grupos tratados e não tratados frente ao biofilme de *C. albicans*, a atividade celular maior para o grupo tratado, pode ser justificada por alterações que o ozônio induziu sobre os componentes de matriz, com consequente ruptura da mesma. As camadas internas podem ter sido expostas, com subsequente liberação de micro-organismos viáveis, cuja concentração do ozônio não foi capaz de matar. Evento comum, na avaliação geral, para os tempos de 2 e 5 minutos. A manutenção da concentração do ozônio diluído em água é um fator de extrema importância para atividade antimicrobiana do mesmo, conforme descrição previa estabelecida por Traina et al. (2007) e Traina (2008).

O índice de viabilidade celular inferior do grupo controle se comparado ao tratado, também foi um fato inédito. A utilização do ozônio em baixas concentrações, comum neste estudo, pode ser uma estratégia segura de oxigenação local, pelo maior aporte de íons de

oxigênio, o que certamente pode melhorar a atividade celular, mas não o suficiente para desinfecção.

Características microbiológicas individuais devem ser valorizadas neste estudo, frente à suscetibilidade antimicrobiana ao ozônio (NAGAYOSHI et al., 2004b). Este gás diluído em água pode ser considerado uma fonte de suplemento de oxigênio, para alguns micro-organismos, com interferência sobre outros oxidantes celulares e sinalizadores de eventos dependentes do oxigênio. Assim, *C. parapsilosis* correspondeu à espécie mais sensível ao ozônio dentre os micro-organismos estudados. Do mesmo modo, a espécie *S. aureus* sofreu interferência sobre sua viabilidade celular, porém não foi erradicada. Ressalta-se que este estudo foi conduzido apenas com células em biofilme maduro, portanto, maior complexidade de respostas biológicas. Estudos futuros poderão ser mais satisfatórios, se conduzidos com concentrações e tempos de administração maiores.

A presença de células individuais ou em biofilme sobre os corpos de prova tratados com água ozonizada, observada com o recurso de microscopia eletrônica de varredura, garante a informação de que o protocolo, aqui definido, não foi ideal para desinfecção, nem tampouco para remoção microbiana. Ainda, não há respaldo na literatura disponível para explicar amplamente, o mecanismo pelo qual a água ozonizada não atuou sobre os micro-organismos, conforme esperado, para os mesmos critérios adotados nesta pesquisa. Outro aspecto relevante demonstrado nesta pesquisa, pelas imagens de MEV, retratou irregularidades sobre a superfície da resina e silicone. Conforme descrição prévia, a polimerização e subsequente polimento da resina não é um processo uniforme, o que leva variações estruturais sobre sua superfície (RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1998). De modo geral, a presença de micro orifícios e/ou irregularidades se constitui como uma condição predisponente para formação e estruturação de complexos microbianos, com maior dificuldade para sua erradicação.

Novamente, propriedades biológicas individuais de virulência – biofilme – para as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis* devem ser consideradas, uma vez que micro-organismos remanescentes foram vistos em associação com as resinas, mesmo após tratamento com água ozonizada. Provavelmente, a força de aderência microbiana aos diferentes tipos de superfície foi determinante para colonização, e conseqüentemente, manutenção em biofilme, com aprisionamento destas espécies, como já mencionado nos estudos de Arita et al. (2005), Subramani et al. (2009), Kurtulmus et al. (2010) e Ariani et al. (2012).

Na atual pesquisa, a solução de gluconato de clorexidina, considerada padrão ouro na odontologia, apresentou ação antimicrobiana mais efetiva se comparada à água ozonizada.

Este resultado apoia o estudo de Ariani et al. (2015), no qual o gluconato de clorexidina foi o produto mais efetivo contra biofilmes mistos. Em biofilmes, o tempo de contato com a solução de gluconato de clorexidina, superior a 3 minutos já apresenta atividade antimicrobiana (HOPE; WILSON, 2004). Assim, 10 minutos, favoreceu a melhor atividade antimicrobiana, porém não foi capaz de retirar as células remanescentes, em grupo ou isoladas sobre a superfície da resina. Em consideração à alteração da superfície dos corpos de prova de resina e silicone tratados por esta solução nesta pesquisa, se faz necessária uma análise criteriosa sobre o real benefício desta solução como desinfetante, uma vez que rugosidades potencializam a formação de biofilme.

Diante da ineficácia da água ozonizada para atuar sobre aglomerados microbianos aderidos às resinas e silicones, demonstrados neste estudo, vale ressaltar que, estes, caracterizaram-se como biofilmes maduros, condição que implica na redução da penetração de agentes antimicrobianos até as camadas mais profundas, sobretudo em concentrações e tempos insuficientes. Estes dados corroboram com outros estudos, no que se refere à resistência do biofilme aos desinfetantes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; SENA et al., 2006; VAN ACKER; VAN DIJCK; CONYE, 2014). Quando constituídos em biofilme, os micro-organismos diferem muito no fenótipo em comparação com seus homólogos na forma planctônica. Embora, dados não demonstrados neste estudo, as células planctônicas, das mesmas espécies e sob as mesmas condições experimentais, porém em fluxo contínuo, se apresentaram inviáveis após o contato com solução aquosa de ozônio – estudo piloto de nosso grupo de pesquisa. Considerando-se dados pertinentes da literatura, resultados mais satisfatórios foram obtidos quanto à erradicação do biofilme, com soluções aquosas de ozônio em fluxo contínuo, porém sobre o tempo de contato maior, isto é, de 60 até 360 minutos de tratamento (AL-SAAD et al., 2015). Considerando-se concentrações maiores de ozônio, o estudo conduzido por Arita et al. (2005), apresenta resultados mais promissores.

Aspectos como a instabilidade, reatividade, presença de matéria orgânica, pH, temperatura, tipo de equipamento, fluxo contínuo/interrompido, devem ser levados em consideração para estudos sobre atividade antimicrobiana da água ozonizada, já que, estes, comprovadamente exercem influência sobre sua ação (RICE et al., 1981; LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999; LAPOLLI et al., 2003; DI BERNARDO; DANTAS, 2005; ZUMA; LIN;

JONNALAGADDA, 2009). Isso possivelmente justifique o fato, de os resultados serem controversos sobre a ação do ozônio em solução, nos estudos *in vitro*. Portanto, mais evidências são necessárias antes que o ozônio possa ser aceito como um produto alternativo de desinfecção, tanto para células planctônicas como para biofilme.

Os dados deste estudo comprovam a necessidade de se associar dois métodos de higienização das próteses: mecânico e químico, visto que os dois tipos de tratamento químicos aqui adotados não foram eficazes contra o biofilme (GOIATO et al., 2010a; PESQUEIRA et al., 2011).

O resultado da atual pesquisa, quanto à resistência flexural, adotando-se dois tratamentos distintos – água ozonizada e gluconato de clorexidina, mostrou que não houve diferença significativa entre os mesmos, ambos se comportaram de forma equivalente frente às propriedades mecânicas da resina. De acordo com estudos prévios da literatura, o uso de produtos químicos convencionais, incluindo o gluconato de clorexidina interfere sobre as propriedades físicas dos materiais, o que implica na qualidade da resina (ROSE et al., 2000; GOIATO et al., 2009; GOIATO et al., 2010a; PESQUEIRA et al., 2011).

Diante dos resultados aqui apresentados é possível afirmar que a resina acrílica ativada quimicamente teve o mesmo comportamento frente aos dois tipos de tratamento utilizados neste estudo. Pôde-se observar que tanto a água ozonizada quanto o gluconato de clorexidina tiveram resultados semelhantes sobre as propriedades mecânicas da resina. A resistência flexural é influenciada pelo grau de conversão dos monômeros em polímeros, alcançado durante a polimerização do material. Assim, quanto maior o grau de conversão, maior a resistência flexural da resina, resultando na melhoria de outras propriedades (LEVIN; SANDERS; REITZ, 1989). De fato, neste estudo, os dois tipos de tratamentos certamente atuaram de forma similar sobre o polimetilmetacrilato (PMMA), durante os 30 dias de ciclagem.

As resinas possuem a propriedade de sorver água, quando imersas em líquidos durante certo período de tempo, devido à polaridade dos seus polímeros e ao fenômeno de difusão. Esta sorção de água leva a uma expansão (em torno de 0,3% linearmente) que compensa a contração da resina, o que ocorre durante o processo de polimerização, fato considerado benéfico. Por outro lado, a solubilidade da resina em água, pode ocasionar a perda de elementos constituintes através do lixiviamento (ANUSAVISE, 1998). A sorção de líquidos afeta as propriedades mecânicas das resinas acrílicas, podendo ainda estar associada ao manchamento das próteses. A solução de clorexidina como agente de desinfecção de próteses,

deve ser indicada com cautela, visto que existem efeitos adversos quando utilizada em longo prazo, como por exemplo, o manchamento dos materiais protéticos (dentes e base acrílica), além da alteração do paladar, se utilizada como enxaguatório bucal (PARANHOS et al., 2007; GOIATO et al., 2012; MORENO et al., 2013).

De acordo com Rezende (1975) e Rezende e Oliveira (1976), os materiais destinados para próteses faciais tendem a aumentar a dureza com o envelhecimento natural. O ideal, segundo Barnhart (1960) é que o material mantenha a sua flexibilidade por longo período de tempo. Neste estudo, apesar do silicone MDX4-4210 ter sofrido um aumento na sua dureza SHORE A em função do tempo de armazenagem em água destilada e da ação da desinfecção com água ozonizada, comparados ao período imediato, os valores médios se mantiveram dentro da faixa considerada desejável para próteses faciais (25 a 35 unidades SHORE A). Isto, provavelmente ocorreu como resultado da polimerização contínua que sofrem os materiais elastoméricos ao longo do tempo, evento que favorece o enrijecimento do silicone (ANUSAVICE, 2003; GOIATO et al., 2009).

O aumento da dureza do silicone, aliada à cor e diferentes períodos, não foi significativa, à exceção entre os períodos de 30 dias de armazenagem em água destilada e 30 dias de tratamento com água ozonizada para o grupo de silicone de pigmento médio. Este fato pode ser explicado em função de que, na composição desse pigmento há uma quantidade de óxido de ferro (Fe_2O_3), um componente inorgânico que promove estabilidade aos compostos do silicone (HAUG; ANDRES; MOORE, 1999a; 1999b). Como já demonstrada, a pigmentação das próteses faciais, pode alterar as características e propriedades físicas do material (GUIOTTI; GOIATO, 2003; 2004; GOIATO et al., 2009; 2010a), promovendo sua melhoria, com aumento do tempo de vida útil do material (KIAT-AMNUAY; LEMON; POWERS, 2002; KIAT-AMNUAY et al., 2006; PESQUEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

Neste estudo, a redução da dureza do silicone após desinfecção de 30 dias com água ozonizada, em relação a 30 dias de armazenagem em água destilada, constituiu um evento inédito. Na literatura, é comprovado que o uso recorrente de produtos químicos convencionais de desinfecção/limpeza na prática clínica, leva ao aumento de dureza (GUIOTTI; GOIATO; SANTOS, 2010). Ressalta-se a necessidade de se buscar novas alternativas de desinfecção, com produtos efetivos e inertes, tanto para o portador quanto para prótese (POLYSOIS, 1999b). Parece promissor que o tratamento com água ozonizada seja incluído nos protocolos de desinfecção de próteses de silicone, quanto à dureza, visto que, quanto mais macios, maior

adaptabilidade e característica de naturalidade a prótese. Todos os grupos de silicone (com ou sem pigmento), submetidos ou não à desinfecção com água ozonizada apresentaram valores ideais de dureza SHORE A, durante a ciclagem de 30 dias, mantendo um requisito fundamental para a textura das próteses faciais: a flexibilidade (CARVALHO, 1989; LEWIS; CASTLEBERRY, 1980).

Apesar do silicone MDX4-4210 ter sofrido um aumento na sua dureza SHORE A em função do tempo de armazenagem em água destilada e gluconato de clorexidina, comparados ao período imediato, os valores médios se mantiveram dentro da faixa considerada desejável para próteses faciais. Este discreto aumento pode ter ocorrido como resultado da polimerização contínua que os materiais elastoméricos sofrem ao longo do tempo, evento que favorece o enrijecimento do silicone (ANUSAVICE, 2003; GOIATO et al., 2009). Interessantemente, a solução de gluconato de clorexidina apresentou uma menor alteração na dureza, quando comparada ao período de 30 dias de armazenagem em água destilada, evento bastante favorável, visto que, o uso recorrente dos produtos convencionais de desinfecção na prática clínica, comprovadamente alteram as propriedades físicas de diversos materiais. Novamente, destaca-se o grupo de pigmento médio com menor dureza, após o tratamento com gluconato de clorexidina. Possivelmente, este fato ocorreu, uma vez que, o pigmento pode sofrer dissolução quando compostos químicos são utilizados, promovendo alterações de resistência à compressão deste pigmento. Neste sentido, as partículas se tornam mais frágeis, com provável degradação e dissolução dos pigmentos (GOIATO et al., 2004).

O grupo de silicone preto destacou-se frente aos valores de dureza sem significância estatística entre os períodos de 30 dias em água destilada e gluconato de clorexidina. O pigmento preto possui o elemento químico cobalto (Co), que funciona como uma partícula de carga, a qual interage com a matriz do silicone, dando maior estabilidade (GOIATO et al., 2004). Este dado pode justificar a estabilidade da dureza do silicone de pigmento preto, aqui observada.

A desinfecção química das próteses bucomaxilofaciais com soluções desinfetantes não irritantes garante a manutenção da saúde dos tecidos, pois quando devidamente higienizadas, minimizam o risco de infecções (YU; KORAN; CRAIG, 1980). Para este fim, destacam-se o sabão neutro e as soluções efervescentes de gluconato de clorexidina de 2 a 4%; no entanto, sua exposição frequente pode interferir nas propriedades físicas do silicone (GOIATO et al., 2010a; PESQUEIRA et al., 2011).

O presente estudo apresentou algumas limitações quanto ao uso da água ozonizada sobre propriedades microbiológicas, entretanto foi pioneiro em avaliar as alterações nas propriedades mecânicas de RAAQ e do silicone MDX4-4210 tratados com esta solução.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- A água ozonizada na concentração de 1,00 PPM-mg/L, em fluxo interrompido, não exerce ação antimicrobiana sobre biofilmes maduros de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *S. aureus*, para os tempos de tratamento estabelecidos;

- A solução de gluconato de clorexidina é mais efetiva do que água ozonizada, quanto à diminuição da viabilidade celular de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *S. aureus* em biofilme sobre resina e silicone;

- A água ozonizada e a solução de gluconato de clorexidina não diferem quanto ao efeito sobre a resistência flexural de resinas acrílicas ativadas quimicamente;

- Todos os grupos, pigmentados ou não, submetidos ou não ao tratamento químico apresentaram valores clinicamente aceitáveis de dureza SHORE A;

- As duas soluções desinfetantes, água ozonizada e gluconato de clorexidina não atuam na erradicação de células remanescentes em biofilme;

- Irregularidades na superfície da resina acrílica e silicone podem funcionar como um reservatório de micro-organismos que, mesmo após tratamentos químicos de desinfecção, permanecem aderidos ao material, havendo a necessidade da associação de métodos de higienização: mecânico e químico;

- Adequações sobre os parâmetros tempo, concentração e ação contínua do ozônio deverão ser instituídas para novos protocolos de desinfecção, minimizando o risco para infecção bucomaxilofacial.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALMÁZ, M. E.; SONMEZ, I. S. Ozone therapy in the management and prevention of caries. **Journal of the Formosan Medical Association**, Taipei, v.114, n.1, p. 3-11, Jan. 2015.
- ALMEIDA, E. et al. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.818-824, Sept.-Oct. 2004.
- AL-SAAD, H. et al. Ozonated saline shows activity against planktonic and biofilm growing *Staphylococcus aureus* in vitro: a potential irrigant for infected wounds. **International Wound Journal**, Chichester, Jan. 2015.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **Designation D2240: Standard Test Methods for Rubber Properties: Durometer hardness**. Philadelphia, 1988.
- AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. **Specifications n° 12 for denture base polymers**. Councils on dental materials and devices, reports of councils and bureaus. **Journal American Dental Association**, Chicago, v.90, p.39-49, 1975.
- ANUSAVICE, K. J. **Phillips materiais dentários**. In: ANUSAVICE, K. J. **Phillips materiais dentários**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.25-128, 136, 150-55.
- ANUSAVICE, K. J. **Phillips' Science of Dental Materials**. 11th ed. New York: Elsevier Science, 2003.
- ARANA, I. et al. Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.86, n.5, p.883-888, May 1999.
- ARIANI, N. Microbial biofilms on facial prostheses. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, New York, v.28, n.6, p.583-591, July 2012.
- ARIANI, N. et al. Current state of craniofacial prosthetic rehabilitation. **The International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v.26, n.1, p.57-67, Jan.-Feb. 2013.
- ARIANI, N. et al. Efficacy of cleansing agents in killing microorganisms in mixed species biofilms present on silicone facial prostheses – an in vitro study. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, Apr. 2015.
- ARITA, M. et al. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v.20, n.4, p.206-10, Aug. 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONIOTERAPIA. **A ozonioterapia**. São Paulo, 2015. Disponível em: < <http://www.aboz.org.br/ozonioterapia/>>. Acesso em: 23 fev. 2015.

BABLON, G. et al. Practical applications of ozone: principles and case studies. In: LANGLAIS, G.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. (Ed.). **Ozone in water treatment: application and engineering**. Chelsea: Lewis, 1991. p.133-316.

BADER, H.; HOIGNÉ, J. Determination of ozone in water by the indigo method: a submitted standard method. **Ozone: Science & Engineering**, New York, v.4, n.4, p.169-176, 1982.

BAI, S. et al. Development and application of a rapid rehabilitation system for reconstruction of maxillofacial soft-tissue defects related to war and traumatic injuries. **Military Medical Research**, v.1, n.11, p.1-12, June 2014.

BARNHART, G. W. A new material and technic in the art of somato-prosthesis. **Journal of Dental Research**, v.39, n.4, p.836-844, Jul.-Aug. 1960.

BAYSAN, A.; WHILEY, R. A.; LYNCH, E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. **Caries Research**, v.34, n.6, p.498-501, Nov.-Dec. 2000.

BRAZ, J. D. et al. Genetic evaluation and activity of antifungal against clinical isolates *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Medical and Health Sciences Research**, v.1, n.10, p.119-25, 2014.

BENOIST, M. Utilisation des résines souples em prothèse maxillo-faciale. **Revue Stomatol**, v.63, n.6, p.532-33, 1962.

BERNARDIS, F. et al. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *C. parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.11, p.3481-88, Nov. 1999.

BIALOSZEWSKI, D. et al. Antimicrobial activity of ozonated water. **Medical Science Monitor**, v.16, n.9, p.71-75, Sept. 2010.

BIALOSZEWSKI, D. et al. Activity of water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Medical Science Monitor**, v.17, n.11, p.339-344, Nov. 2011.

BULBULIAN, A. H. Maxillofacial prosthetics: evolution and practical application in patient rehabilitation. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.15, n.3, p.554-69, May-June 1965.

CABO, M. L. et al. Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. **Food Control**, v.20, n.5, p.521-25, May 2009.

CALCATERRA, R. et al. Occurrence of *Candida* species colonization in a population of denture-wearing immigrants. **International Journal Immunopathology and Pharmacology**, v.26, n.1, p.239-246, Jan.-Mar. 2013.

CANTÓN, E. et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*,

and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.12, p.5590-5596, Dec. 2011.

CARDOSO, C. C. et al. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.1, p.59-61, Jan.-Abr. 2003.

CARVALHO, J. C. M. **Avaliação das propriedades físicas de duas novas siliconas para uso em prótese facial**. 1989. 93f. Tese (Livre-docência)-Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

CASE, P. D. et al. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. **Journal of Endodontics**, v.38, n.4, p.523-26, Apr. 2012.

CELIBERTI, P., PAZERA, P., LUSSI, A. The impact of ozone treatment on enamel physical properties. **American Journal Dentistry**, v.19, n.1, p.67-72, Feb. 2006.

CHO, M. et al. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. **Water Research**, v.44, n.11, p.3410-18, June 2010.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.21, p.1318-1322, 1999.

DAVE, S. et al. Kinetics of inactivation of *Salmonella enteritidis* by ozone. **Institute of Food Technologists Annual Meeting. Book of Abstracts**, p.15, 1998.

DE BOER, H. E. L. et al. Use of Gaseous Ozone for Eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From the Home Environment of a Colonized Hospital Employee. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v.27, n.10, p.1120-1122, Oct. 2006.

DIAO, H. F. et al. Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. **Process Biochemistry**, v.39, n.11, p.1421-1426, July 2004.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. Métodos e técnicas de tratamento de água. São Carlos: Rima, 2005. v.2.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167-193, Apr. 2002.

DOUGLAS, J. L. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v.11, n.1, p.30-36, Jan. 2003.

ELENI, P. N. et al. Effect of different disinfecting procedures on the hardness and color stability of two maxillofacial elastomers over time. **Journal of Applied Oral Science**, v.21, n.3, p.278-283, May-June, 2013.

FALCÃO, A. F. P.; SANTOS, L. B.; SAMPAIO, N. M. Candidíase associada a próteses dentárias. **Sitienbus**, n.30, p.135-146, Jan.-Jun. 2004.

FARIA, I. S. et al. Effects of ozonated water on *Candida albicans* oral isolates. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v.4, n.14, p.783-86, Jul.-Sept. 2005.

FERREIRA, S. et al. Ozonioterapia no controle da infecção em cirurgia oral. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v.34, n.1, p.36-38, 2013.

FINCH, G. R.; SMITH, D. W.; STILES, M. E. Dose-response of *Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. **Water Research**, v.22, n.2, p.1563-1570, Dec. 1988.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Review Microbiology**, v.8, p.623-633, Sept. 2010.

GOIATO, M. C. et al. Avaliação da recuperação elástica e da resistência ao rasgamento de um silicone para uso em prótese facial sob a influência da pigmentação e da desinfecção química. **Revista de Odontologia da Unesp**, v.33, n.4, p.189-194, 2004.

GOIATO, M. C. et al. Color Stability Comparison of Silicone Facial Prostheses Following Disinfection. **Journal of Prosthodontics**, v.18, n.3, p.242-244, Apr. 2009.

GOIATO, M. C. et al. Influence of opacifiers on dimensional stability and detail reproduction of maxillofacial silicone elastomer. **BioMedical Engineering OnLine**, v.9, p.85, Dec. 2010a.

GOIATO, M. C. et al. Hardness evaluation of prosthetic silicones containing opacifiers following chemical disinfection and accelerated aging. *Brazilian Oral Research*, v. 24, n. 3, p. 303–308, July-Sept. 2010b.

GOIATO, M. C. et al. Effect of thermal cycling and disinfection on colour stability of denture base acrylic resin. **Gerodontology**, v.29, n.2, p.838-844, 2012.

GOPALAKRISHNAN, S.; PARTHIBAN, S. Ozone: A New Revolution in Dentistry. **Journal of Bio Innovation**, v.3, n.1, p.58-69, 2012.

GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, Chicago, v.51, n.6, p.72-75, 1997.

GREEN, A. K.; SMITH, G. W.; KNIGHT, C. S. Ozone in dairy chilling water systems: effect on metal materials. **International Journal of Dairy Technology**, v.52, n.4, p.126-128, Nov. 1999.

GUIOTTI, A. M.; GOIATO, M. C. Silicones para próteses faciais: efeito da pigmentação e envelhecimento sobre dimensão e superfície. **Ciência Odontológica Brasileira**, v.6, n.3, p.86-97, Jul.-Set. 2003.

GUIOTTI, A. M.; GOIATO, M. C. Silicones para próteses faciais: efeito da desinfecção química sobre dimensão e superfície. Parte 2. **Ciência Odontológica Brasileira**, v.7, n.1, p.93-103, Jan.-Mar. 2004.

GUIOTTI, A. M. **Avaliação de silicones para próteses faciais em função do efeito do tempo de armazenagem, da desinfecção química e da pigmentação sobre a deterioração**

marginal e a dureza SHORE A. 2006. 140f. Tese (Doutorado em Odontologia)-Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2006.

GUIOTTI, A. M.; GOIATO, M. C.; SANTOS, D. M. Evaluation of the Shore A Hardness of Silicone for Facial Prosthesis as to the Effect of Storage Period and Chemical Disinfection. **The journal of craniofacial surgery**, v.21, n.2, p. 323-327, 2010.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, v.37, n.4, p.453-460, 2004.

HANSON, M. D. et al. Commercial cosmetics and their role in the coloring of facial prostheses. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.50, n.6, p.818-820, Dec. 1983.

HAAS, C.N.; KAYMAK, B. Effect of initial microbial density on inactivation of *Giardia muris* by ozone. **Water Research**, v.37, n.12, p.2980-2988, July 2003.

HAUG, S. P.; MOORE, B. K.; ANDRES, C. J. Color stability and colorant effect on maxillofacial elastomers. Part 1: colorant effect on physical properties. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.81, n.4, p.418-422, 1999a.

HAUG, S. P.; MOORE, B. K.; ANDRES, C. J. Color stability and colorant effect on maxillofacial elastomers. Part 2: weathering effect on physical properties. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.81, n.4, p.423-430, 1999b.

HAWSER, S. P. et al. Comparison of a 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfohenyl)-5-[(Phenylamino) Carbonyl]-2H-Tetrazolium Hydroxide (XTT) Colorimetric Method with the Standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards Method of Testing Clinical Yeast Isolates for Susceptibility to Antifungal Agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.5, p.1450-1452, May 1998.

HOPE, C. K.; WILSON, M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.48, n.5, p.1461-1468, May 2004.

HORVATH, M.; BILITZKY, L.; HUTTNER, J. Fields of utilization of ozone. In: R. J. H. Clark (Ed.). **Ozone**. New York: Elsevier Science, 1985. p.257-316.

HUNT, N. K.; MARIÑAS, B. J. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone water. **Water Research**, v.31, n.6, p.1355-1362, June 1997.

HUTH, K. C. et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. **International Endodontic Journal**, v.42, n.1, p.3-13, Jan. 2009.

HUTH, K. C. et al. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. **European Journal of Oral Sciences**, v.119, n.3, p. 04-210, 2011.

JOHANSON, E.; CLAESON, R. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. **Journal of Dentistry**, v.37, n.6, p.449-453, 2009.

- KATTI, S. S.; CHAVA, V. K. Effect of Ozonised water on Chronic Periodontitis: a Clinical Study. **Journal of International Oral Health**, v.5, n.5, p.79-84, Oct. 2013.
- KAZANJI, M. N. M.; WATKINSON, A. C. Soft lining materials: their absorption of, and solubility in, artificial saliva. **British Dental Journal**, v.165, n.3, p.91-94, Aug. 1988.
- KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, Nov. 2001.
- KIAT-AMNUAY, S.; LEMON, J. C.; POWERS, J. M. Effect of opacifiers on color stability of pigmented maxillofacial silicone A-2186 subjected to artificial aging. **Journal Prosthodontics**, v.11, n.2, p.109-116, June 2002.
- KIAT-AMNUAY, S. K. et al. The influence of water storage on durometer hardness of 5 soft denture liners over time. **Journal Prosthodontics**, v.14, n.1, p.19-24, Mar. 2005.
- KIAT-AMNUAY, S. et al. Interactions of pigments and opacifiers on color stability of MDX4-4210/type A maxillofacial elastomers subjected to artificial aging. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.95, n.3, p.249-257, Mar. 2006.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; CHRISM, G. W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, n.1, p.17-34, Apr. 1999.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. **Journal of Food Protection**, v.62, n.9, p.1071-1087, Sept. 1999.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; KHADRE, M. A. Ozone and its current and future application in the food industry. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.45, p.167-218, 2003.
- KOROL, S. et al. Desinfecção da água: ação comparativa del ozono y cloro sobre um amplo espectro bacteriano. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.27, n.4, p.175-83, Oct.-Dec. 1995.
- KRCMERY, V.; BARNES, A. J. *Non-albicans Candida spp.* Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v.50, n.4, p.243-260, Apr. 2002.
- KURTULMUS, H. et al. *Candida albicans* adherence on silicone elastomers: effect of polymerisation duration and exposure to simulated saliva and nasal secretion. **Dental Materials**, v.26, n.1, p.76-82, Jan. 2010.
- LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. Ozone in water treatment: application and engineering. Chelsea: **AWWARF and Lewis Publishers**, 1991. 568 p.
- LANITA, C. S.; SILVA, S. B. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.3, p.182-189, Jul.-Set. 2008.

LAPOLLI, F. R. et al. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: GONÇALVES, R. F. (Coord.). **Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas**: aplicação para fins produtivos como agricultura, agricultura e hidropônica. Vitória: PROSAB, 2003. p.169-208.

LEID, J. G. et al. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. **Journal of Immunology**, v.175, n.11, p.7512-7518, Dec. 2005.

LEMON, J. C. et al. Color stability of facial prostheses. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.74, n.6, p.613-618, Dec. 1995.

LEVIN, B.; SANDERS, J. L.; REITZ, P. V. The use of microwave energy for processing acrylic resins. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.61, n.3, p.381-383, Mar. 1989.

LEWIS, D. H.; CASTLEBERRY, D. J. An assessment of recent advances in external maxillofacial materials. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.43, n.4, p.426-432, Apr. 1980.

LUDDEKE, F. et al. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. **Water Research**, v.69, p.243-251, Feb. 2015.

LUO, X. et al. Detoxification of aflatoxin in corn flour by ozone. **Journal of the science of food and agriculture**, v.94, n.11, p.2253-2258, Aug. 2014.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

MAHFOUDH, A. et al. Inactivation of Vegetative and Sporulated Bacteria by Dry Gaseous Ozone. **Ozone: Science & Engineering**, New York, v.32, n.3, Feb. 2010.

MALLMANN, A. et al. Resistência flexural de resinas compostas imersas em diferentes líquidos. **Robrac: Revista Odontológica do Brasil-Central**, Goiânia, v.18, n.45, p.11-17, 2009.

MANCUSO, D. N.; GOIATO, M. C.; SANTOS, D. M. Color stability after accelerated aging of two silicones, pigmented or not, for use in facial prosthesis. **Brazilian Oral Research**, v.23, n.2, p.144-148, Apr.-Jun. 2009.

MARIÑO, R. Q.; SCWHARTZ, A. Ozonotherapy and Legislation: Analysis for its regularization. **Revista Española de Ozonoterapia**, v.2, n.1, p.51-90, Nov. 2012.

MARSH, P. D.; HEAD, D. A.; DEVINE, D. A. Ecological Approaches to Oral Biofilms: Control without Killing. **Caries Research**, v.49, p.46-54, Apr. 2015.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVAL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and uv light. **American Society for Microbiology**, v.73, n.14, p.4592-4601, July 2007.

MATSUMOTO, F. E. et al. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.154, n.2, p.63-69, Sept. 2002.

MITRA, A. et al. Maxillofacial Prosthetic Materials-An Inclination Towards Silicones. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.8, n.12, Dec. 2014.

MOORE, D. J. et al. Evaluation of polymeric materials for maxillofacial prosthetics. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.38, n.3, p.319-326, Sept. 1977.

MORENO, A. et al. Effect of different disinfectants on the microhardness and roughness of acrylic resins for ocular prosthesis. **Gerodontology**, v.30, n.1, p.32-39, 2013.

NAGAYOSHI, M. et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **Journal of Endodontics**, v.30, n.11, p.778-781, Nov. 2004a.

NAGAYOSHI, M. et al. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v.19, n.4, p.240-246, Aug. 2004b.

NETT, J. E. et al. Optimizing a *Candida* biofilm microtiter plate model for measurement of antifungal susceptibility by tetrazolium salt assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.4, p.1426-1433, Apr. 2011.

NEVES, A. C. C.; VILLELA, L. C. Desenvolvimento de uma escala em silicóna para tons de pele humana. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.12, n.1, p.57-63, Jan.-Mar. 1998.

NOGALES, C. G. et al. Ozone therapy in medicine and dentistry. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v.9, n.4, p.75-84, May 2008.

NOGALES, C. G. et al. Comparison of the antimicrobial activity of three different concentrations of aqueous ozone on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*: in vitro study. **Revista Española de Ozonoterapia**, v.4, n.1, p.9-15, 2014.

OLIVEIRA, D. T. N. **Efeito da desinfecção na resistência flexural e na topografia da superfície de resina acrílica ativada quimicamente**. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado Odontologia)-Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2011.

ORIBE, J. A. Las gomas de siliconas en prosthesis restauratriz maxilo-facial. **Revista Espanhola de Estomatologia**, v.13, n.1, p.34-42, Jan.-Fev. 1965.

- PARANHOS, R. M. et al. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. **Journal of Applied Oral Science**, v.15, n.1, p.33-38, Feb. 2007.
- PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v.72, n.2, p.157-165, Feb. 2008.
- PESQUEIRA, A. A. et al. Effect of Disinfection and Accelerated Aging on Color Stability of Colorless and Pigmented Facial Silicone. **Journal of Prosthodontics**, v.20, n.4, p.305-309, June 2011.
- PIRANI, S. **Application of ozone in food industries**. 2011. 133f. Tese (Doutorado)-Universita degli Studi di Milano, 2011.
- PITANGUI, N. S. et al. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, New York, v.28, n.7, p.711-718, Mar.-July 2012.
- PHILLIPS, R. W. *Skinner Materiais Dentários*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. v.25. p.91.
- POLYZOIS, G. L. Color stability of facial silicone prosthetic polymers after outdoor weathering. **Journal Prosthetic Dentistry**, v.82, n.4, p.447-450, Oct. 1999a.
- POLYZOIS, G. L. Mechanical properties of 2 new addition-vulcanizing silicone prosthetic elastomers. **The International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v.12, n 4, p.359-362, Jul.-Aug. 1999b.
- POLYZOIS, G. L. et al. Physical properties of a silicone prosthetic elastomer stored in simulated skin secretions. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.83, n.5, p.572-577, May 2000.
- PRESTES, E. B. **Avaliação da eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças folhosas minimamente processadas**. 2007. 135f. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- RADFORD, D. R.; CHALLACOMBE, S. J.; WALTER, J. D. Adherence of phenotypically switched *Candida albicans* to denture base materials. **The International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v.11, n.1, p.75-81, Jan.-Feb. 1998.
- RAJENDRAN, R. et al. Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans* biofilm formation from patients with type 1 diabetes. **Mycopathologia**, v.170, n.4, p.229-235, Oct. 2010.
- RAMAGE, G. et al. Our current understanding of fungal biofilms fungal. **Critical Reviews in Microbiology**, v.35, n.4, p.340-355, Nov. 2009.
- RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.18, n.4, p.163-170, Dec. 2001.

RAMIREZ, G. A. et al. Potential efficacy of ozonation as a *Salmonella* decontamination method in broiler carcasses. **Poultry Science Abstracts**, v.73, p.21, 1994.

RESTAINO, L. et al. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.9, p.3471-3475, Sept. 1995.

REZENDE, J. R. V. Alterações de dimensão linear e de dureza Shore A em função do envelhecimento e da inclusão de tela de “nylon”. **Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.13, n.1, p.45-54, 1975.

REZENDE, J. R. V.; OLIVEIRA, J. A. P. Alterações de contração e de dureza Shore A do P.V.C. Cordo em função do tipo de plastificante e do envelhecimento. **Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.14, n.2, p.239-244, 1976.

RICE, J. O. et al. Uses of ozone in drinking water treatment. **Journal American Water Works Association**, v.73, n.1, p.44-57, Jan. 1981.

ROSE, E. C. et al. Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials. **Journal of Orofacial Orthopedics**, v.61, n.4, p.246-257, Apr. 2000.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826p.

SADATULLAH, S.; MOHAMED, N. H.; RAZAK, F. A. The antimicrobial effect of 0.1 ppm ozonated water on 24-hour plaque microorganisms in situ. **Brazilian Oral Research**, v.26, n.2, p.126-131, Apr. 2012.

SADATULLAH, S.; MOHAMED, N. H.; RAZAK, F. A. Qualitative analyses of the antimicrobial effect of ozonated water on supragingival plaque and salivary microbes. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, v.4, n.4, p.526-531, July 2014.

SAINI, R. Ozone therapy in dentistry: a strategic review. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v.2, n.2, p.151-153, 2011.

SANTOS, D. M. et al. Influence of Pigments and Opacifiers on Color Stability of an Artificially Aged Facial Silicone. **Journal of Prosthodontics**, v.20, p.205-208, 2011.

SANTOS, D. M. et al. Effect of addition of pigments and opacifier on the hardness, absorption, solubility and surface degradation of facial silicone after artificial ageing. **Polymer Degradation and Stability**, v.97, n.6, p.1249-1253, Aug. 2012.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v.62, p.10-24, Jan. 2013.

SCHEIE, A. A. et al. Effect of orthodontic treatment on prevalence of *Streptococcus mutans* in plaque and saliva. **Scandinavian Journal of Dental Research**, Copenhagen, v.92, n.3, p.211-217, June 1984.

SEIDLER, V. et al. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. **Prague Medical Report**, v.109, n.1, p.5-13, Feb.-June 2008.

SELMA, M. V. et al. Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water. **Food Microbiology**, v.24, n.5, p.492-499, Aug. 2007.

SENA, N. T. et al. *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. **International Endodontic Journal**, v.39, n.11, p.878-885, Nov. 2006.

SINGH, G.; SINGH, A. K. Localized corrosion in chlorine dioxide bleach media of paper industry. **Bulletin of Electrochemistry**, v.15, n.3/4, p.127-130, 1999.

SIQUEIRA, J. F.; BILGE, H. S. Fungi in endodontic infections. **Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.97, n.5, p.632-641, May 2004.

SHARMA, M.; HUDSON, J. B. Ozone gas in an effective practical antibacterial agent. **American Journal of Infection Control**, v.36, n.8, p.559-563, Oct. 2008.

SOLL, D. R. *Candida* Biofilms: Is Adhesion Sexy? **Current Biology**, v.18, n.16, p.717-720, Aug. 2008.

STAEHELIN, J.; HOIGNÉ, J. Decomposition of ozone in water in the presence of organic acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. **Environmental Science & Technology**, v.19, n.12, p.1206-1213, Dec. 1985.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **4500-O₃ Ozone (Residual)**: Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC, 1997. Disponível em: https://archive.org/stream/gov.law.apha.method.4500-o3.1992/apha.method.4500-o3.1992_djvu.txt. Acesso em: 24 mar. 2014.

STÜBINGER, S.; SADER, R.; FILIPPI, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. **Quintessence International**, v.37, n.5, p.353-359, May 2006.

SUBRAMANI, K. et al. Biofilm on dental implants: a review of the literature. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.24, n.4, p.616-626, Jul.-Aug. 2009.

TAKAHASHI, N. Microbial ecosystem in the oral cavity: metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. **International Congress Series**, v.1284, p.103-112, Sept. 2005.

TAYLOR, R.; MARYAN, C.; VERRAN, J. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.80, n.5, p.592-597, Nov. 1998.

TORRES, E. A. F. S.; REGÊ FERREIRA, A. F.; RÍMOLI, C. D. Estudos das propriedades desinfetantes do ozônio em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.10, n.42, p.8-23, 1996.

TRAINA, A. A. et al. Effects of ozonized water in wound healing of rats – morphological analysis. In: Processings of the 24th Annual Meeting Braz. Oral Res., 2007, São Paulo. Atibaia: SBPqO; 2007. p. 162-222.21 (Suppl.1).

TRAINA, A. A. **Efeitos biológicos do ozônio diluído em água: estudo morfológico, istomorfométrico e imunoistoquímico**. 2008. 124f. Tese (Doutorado em Odontologia)-Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TURNER, G. E. et al. Intrinsic color of isophorone polyurethane for maxillofacial prosthetics. Part II: Color stability. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.51, n.5, p.673-675, May 1984.

UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Code of Federal Regulations. Title 9. Part 381.66**: poultry products; temperatures and chilling and freezing procedures. Washington, DC: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 1997.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency (EPA/USEPA). Office of water. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**, Apr. 1999. Disponível em: <http://www.epa.gov/ogwdw/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2014.

VELANO, C. E. E. et al. A avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.15, n.1, p.18-22, Jan.-Mar. 2001.

VERES, E. M.; WOLFAARDT, J. F.; BECKER, P. J. An avaluation of the surface characteristics of a facial prosthetic elastomer. Part 1: review of the literature on the surface characteristics of dental materials with maxillofacial prosthetic application. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.63, n.2, p.193-197, Feb. 1990.

VAN ACKER, H.; VAN DIJCK, P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends in Microbiology**, v.22, n.6, p.326-333, June 2014.

VICTORIN, K. Review of the genotoxicity of ozone. **Mutation Research**, v.277, n.3, p.221-238, Sept. 1992.

VIDAL, F. J. R. **Proceso de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización**. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 2003. 253p.

VISSER, A. et al. Fate of implant-retained craniofacial prostheses: life span and aftercare. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.23, n.1, p.89-98, Jan.-Feb. 2008.

WALTER, R. H.; SHERMAN, R. M. Duration of ozone in water in the upper solubility range. **Journal of Food Science**, v.41, n.5, p.993-995, Sept. 1976.

WICKRAMANAYAKE, G. B. Disinfection and sterilization by ozone. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection and sterilization and preservation**. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiyer, 1991. p.182-190.

WRIGHT, C. J. et al. Microbial interactions in building of communities. **Molecular oral microbiology**, v.28, n.2, p.83-101, Apr. 2013.

YANG, P. P.; CHEN, T. C. Stability of ozone and its germicidal properties on poultry meat microorganisms in liquid phase. **Journal of Food Science**, v.44, n.2, p.501-504, Mar. 1979.

YU, R.; KORAN, A.; CRAIG, R. G. Physical properties of a pigmented silicone maxillofacial material as a function of accelerated aging. **Journal of Dental Research**, v.59, n.7, p.1141-1148, July 1980.

ZHANG, Y. Q. et al. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.111, n.4, p.1006-1015, Oct. 2011.

ZHOU, Y. et al. *In vitro* interactions between aspirin and amphotericin b against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.6, p.3250-3260, June 2012.

ZUMA, F.; LIN, J.; JONNALAGADDA, S. B. Ozone-initiated disinfection kinetics of *Escherichia coli* in water. **Journal of Environmental Science of Health**, v.44, n.1, p.48-56, Jan. 2009.

ZUMA, F. N.; JONNALAGADDA, S. B. Studies on the O₃ - initiated disinfection from Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* in aquatic systems. **Journal of Enviromental Science of Health**, v.45, n.2, p.224-232, 2010.

